

Evolute Optimierung  
mikrobieller Lipasen und Esterasen  
in Hinblick auf  
Substratspezifität und Enantioselektivität

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

von

Dipl. Biol. Stefanie Heil

aus Dieburg

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Korreferent: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 11.07.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2012

Darmstadt 2012

D17

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Schwerpunktprogramms 1170 „Directed Evolution to Optimize and Understand Molecular Biocatalysts“ gefördert.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Lipolytische Enzyme.....	1
1.1.1	$\alpha/\beta$ Hydrolase Faltung und Mechanismus.....	2
1.1.2	Klassifizierung und Eigenschaften bakterieller Lipasen .....	3
1.1.3	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten lipolytischen Enzyme .....	5
1.1.3.1	Esterase A aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	5
1.1.3.2	Lipase und deren spezifische Foldase bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
1.1.3.3	Cutinase aus <i>Fusarium solani pisi</i> .....	9
1.1.3.4	Lipase A aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	10
1.2	Protein Engineering .....	11
1.2.1	Rationelles Protein Design .....	11
1.2.2	Gerichtete Evolution .....	11
1.2.2.1	CASTing.....	13
1.3	Hochdurchsatzverfahren zur Durchmusterung von Enzym- Bibliotheken.....	15
1.3.1	Genotyp-Phänotypkopplung als Grundlage für Hochdurchsatzverfahren .....	15
1.3.1.1	Bakterielle Displaysysteme .....	15
1.3.1.1.1	Das Autotransportersystem der Esterase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> zur Oberflächenpräsentation von lipolytischen Enzymen .....	20
1.3.1.2	Hefe-Display .....	21
1.3.1.3	Phage-Display .....	24
1.3.2	Durchmusterung von Enzym-Bibliotheken mit zellbasierter Durchflusszytometrie .....	26

1.3.2.1	Kovalente Kopplung der Enzymaktivität auf der Zelloberfläche: Das ESCAPED-Verfahren.....	28
1.4	Protein Engineering der Enantioselektivität bei Lipasen.....	29
1.5	Zielsetzung.....	34
<b>2</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>35</b>
2.1	Bakterienstämme, Hefestämme, Oligonukleotide und Plasmide .....	35
2.2	Molekulare Marker für Gelelektrophoresen.....	38
2.3	Enzyme und Proteine .....	38
2.4	Chemikalien .....	39
2.5	Sonstige Materialien und Geräte .....	40
2.6	Nährmedien zur Anzucht .....	43
2.6.1	Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	43
2.6.2	Nährmedien zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> .....	44
2.7	Lösungen und Puffer .....	45
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>48</b>
3.1	Handhabung von Mikroorganismen .....	48
3.1.1	Lagerung und Vermehrung von Mikroorganismen .....	48
3.1.1.1	Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen .....	48
3.1.1.2	Anzucht von <i>E. coli</i> Stämmen.....	48
3.1.1.3	Lagerung von <i>S. cerevisiae</i> EBY100.....	48
3.1.1.4	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> EBY100 .....	49
3.1.2	Bestimmung der Zelldichte .....	49
3.1.3	Transformation durch Elektroporation.....	49
3.1.3.1	Erstellung von kompetenten Zellen und Transformation von <i>E. coli</i> .....	49
3.1.3.2	Erstellung von kompetenten Zellen und Transformation von <i>S. cerevisiae</i> EBY100 .....	50

3.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden .....	51
3.2.1	Vorbereitung von Geräten und Lösungen.....	51
3.2.2	Methoden zur Präparation und Analyse von DNA .....	51
3.2.2.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	51
3.2.2.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	52
3.2.2.3	Reinigung von DNA in wässriger Lösung durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln.....	52
3.2.2.4	Alkoholische Präzipitation von DNA.....	52
3.2.2.5	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	52
3.2.2.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten zu Analyse und Reinigung .....	53
3.2.2.7	Separation von DNA-Fragmenten mittels Sucrosedichtegradienten-zentrifugation.....	53
3.2.3	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen .....	54
3.2.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	54
3.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	54
3.2.5.1	SOE-PCR (splicing by overlap extension) .....	55
3.2.5.2	Kolonie PCR.....	56
3.2.6	Sequenzierung .....	56
3.3	Proteinchemische Arbeitsmethoden .....	56
3.3.1	Isolierung von rekombinant hergestellten Proteinen und Proteinreinigung .....	56
3.3.1.1	Herstellung von Zellextrakten .....	56
3.3.1.2	Isolierung von Einschlusskörpern ( <i>inclusion bodies</i> ) .....	57
3.3.1.3	Isolierung von Membranproteinen .....	57
3.3.1.4	Säulenchromatographische Methoden .....	58
3.3.1.4.1	Affinitätschromatographie über $\text{Ni}^{2+}$ Chelating Sepharose.....	58
3.3.1.4.2	Dialyse von Proteinen .....	58
3.3.2	Elektrophoretische Methoden zur Auftrennung von Proteinen.....	59
3.3.2.1	Analyse von Proteinen mittels SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	59

3.3.2.2	Anfärben der Proteine nach der Elektrophorese mittels Coomassie Brilliantblau .....	60
3.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	60
3.3.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	60
3.3.5	Chemische Modifikation von Proteinen.....	61
3.3.5.1	Oxidation und Reinigung von Meerrettich-Peroxidase .....	61
3.3.5.2	Biotinylieren von Proteinen.....	62
3.3.6	Enzymatische Aktivitätstest.....	63
3.3.6.1	Herstellen von Tributyrinplatten .....	63
3.3.6.1.1	Tributyrinplatten für <i>E. coli</i> .....	63
3.3.6.1.2	Tributyrinplatten für <i>S. cerevisiae</i> EBY100.....	63
3.3.6.2	Bestimmung von lipolytischer Aktivität .....	63
3.4	Zellbiologische Arbeitsmethoden .....	65
3.4.1	Induktion plasmidkodierter Genexpression in <i>E. coli</i> .....	65
3.4.2	Induktion plasmidkodierter Genexpression in <i>S. cerevisiae</i> .....	65
3.4.3	Immunfluoreszenzmakierung von Mikroorganismen .....	65
3.4.3.1	Immunfluoreszenzmakierung von <i>E. coli</i> .....	66
3.4.3.2	Immunfluoreszenzmakierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	66
3.4.4	Fluoreszenzmakierung von Mikroorganismen .....	67
3.4.4.1	Fluoreszenzmakierung von <i>E. coli</i> mit Tyramidestern .....	67
3.4.4.2	Fluoreszenzmakierung von <i>S. cerevisiae</i> mit Tyramidestern .....	68
3.4.5	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von markierten <i>S. cerevisiae</i> .....	69
3.4.6	Durchflusszytometrie und Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung.....	69
3.5	Phage-Display Methoden.....	71
3.5.1	Phagen Selektionen.....	71
3.5.2	Amplifikation monoklonaler Phagen und Phagenpools .....	72
3.5.3	Amplifikation von Helferphagen .....	72
3.5.4	Phage-ELISA .....	73

<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>74</b>
4.1	<i>E. coli</i> -basierte Oberflächenpräsentation von Proteinen.....	74
4.1.1	Untersuchungen der Lipase A aus <i>P. aeruginosa</i> und deren zugehöriger Foldase LipH .....	74
4.1.1.1	Expression der Lipase A und der Foldase aus <i>P. aeruginosa</i> .....	75
4.1.2	Oberflächendisplay der Lipase A und der Foldase H auf <i>E. coli</i> .....	77
4.1.2.1	Oberflächendisplay der Lipase A .....	78
4.1.2.2	Funktionelle Analyse der oberflächenexponierten Lipase A.....	82
4.1.2.3	Untersuchung der Bindung zwischen Foldase und Lipase .....	84
4.1.2.3.1	Untersuchung der Bindung zwischen LipH und der Lipase mittels <i>Bio-Layer Interferometry</i> (BLI).....	84
4.1.2.3.2	Untersuchung der Bindung zwischen LipH und der Lipase mittels Durchflusszytometrie.....	86
4.1.2.3.3	Untersuchung der Aktivität von oberflächenpräsentiertem LipA mittels ESCAPED-Verfahren .....	88
4.1.2.3.4	Exkurs: Selektion eines spezifischen cameloiden Antikörpers gegen die Foldase .....	90
4.1.3	Oberflächendisplay der Cutinase aus <i>F. solani pisi</i> auf der Oberfläche von <i>E. coli</i> .....	94
4.1.3.1	Untersuchung der Überlebensrate und deren Optimierung nach Zellsortierung .....	94
4.1.3.2	CASTing und erstellen der CAST-Bibliothek.....	95
4.1.3.2.1	Charakterisierung der einzelnen Unterbibliotheken .....	97
4.1.3.2.2	FACS-Analysen der einzelnen Bibliotheken .....	100
4.1.3.2.3	Durchmusterung der Bibliotheken .....	103
4.1.4	Zusammenfassung und Diskussion zur Zelloberflächenpräsentation auf <i>E. coli</i> .....	107
4.1.4.1	<i>E. coli</i> Oberflächenpräsentation der Lipase A aus <i>P. aeruginosa</i> .....	108
4.1.4.2	<i>E. coli</i> Oberflächenpräsentation der Cutinase aus <i>F. solani pisi</i> .....	109

4.2	Aufbau und Untersuchung eines allgemeinen Verfahrens zur Präsentation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von Hefe .....	112
4.2.1	Klonierung lipolytischer Enzyme zur Oberflächenpräsentation auf Hefen .....	112
4.2.2	Untersuchung der funktionalen Expression der erzeugten Aga2p-Fusionsproteine.....	113
4.2.3	Sequenzierung der lipolytischen Enzyme zur Oberflächenpräsentation auf Hefen.....	113
4.2.4	Untersuchung der Oberflächenexposition der erzeugten Aga2-Fusionsproteine.....	114
4.2.5	Untersuchung der esterolytischen Aktivität der erzeugten Aga2p-Fusionsproteine.....	116
4.2.6	Übertragung des ESCAPED-Verfahrens auf Hefezellen.....	118
4.2.6.1	Einfluss der Färbung auf Zellen und Bestimmung der Überlebensrate .....	120
4.2.6.2	Nachweis einer erfolgreichen Selektion von aktiven Enzymvarianten durch ein Mischungsexperiment .....	120
4.2.7	Zusammenfassung und Diskussion zur Zelloberflächenpräsentation auf Hefe .....	122
4.2.7.1	Oberflächenpräsentation der Lipase A aus <i>P. aeruginosa</i> auf <i>S. cerevisiae</i> .....	122
4.2.7.2	<i>S. cerevisiae</i> Oberflächenpräsentation der Cutinase aus <i>F. solani pisi</i> .....	123
4.2.7.3	<i>S. cerevisiae</i> Oberflächenpräsentation der Lipase aus <i>B. subtilis</i> .....	124



<b>5</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>138</b>
6.1	Übersicht der randomisierten Positionen bei der Cutinase CAST-Bibliotheken .....	138
6.1.1	Übersicht der randomisierten Positionen in der Nukleotidsequenz .....	138
6.1.2	Proteinsequenzen.....	140
6.2	Übersicht FACS-basierter Hochdurchsatzverfahren auf <i>E. coli</i> .....	141
6.3	Abkürzungsverzeichnis .....	143
6.4	Danksagung .....	147
6.5	Lebenslauf.....	148
6.6	Eidesstattliche Erklärung.....	149

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Durch lipolytische Enzyme katalysierte Reaktionen .....	1
Abbildung 2:	$\alpha/\beta$ -hydrolase fold von Lipasen.....	2
Abbildung 3:	Mechanismus der katalytischen Triade von lipolytischen Enzymen.....	3
Abbildung 4:	Faltung und Sekretion der Lipase A aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
Abbildung 5:	Schematische Darstellung von der Durchmusterung von Protein-Bibliotheken .....	12
Abbildung 6:	Schematische Darstellung der Oberflächenpräsentation von Proteinen auf <i>E. coli</i> .....	20
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Oberflächenpräsentation von Proteinen auf <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	22
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Selektion von Bibliotheken über Phage-Display .....	25
Abbildung 9:	Strategien zur Kopplung der Enzymaktivität für die Analyse mittels FACS .....	27
Abbildung 10:	Schematische Darstellung der Biotin-Tyramid-Reaktion .....	29
Abbildung 11:	Überblick über die Optimierung der Lipase aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (modifiziert nach Reetz <i>et al.</i> 2007).....	31
Abbildung 12:	SDS-PAGE nach Überexpression der Lipase A (B) und der Foldase (A) in <i>E. coli</i> Origami(DE3) pLys unter Kontrolle des T7-Promotors in dYT-Medium .....	76
Abbildung 13:	Photometrischer Aktivitätstest von löslichem LipA (Lipase) und LipH (Foldase).....	77
Abbildung 14:	Konstrukte zur Oberflächenpräsentation der Lipase A .....	79
Abbildung 15:	FACS-Analyse der Oberflächenpräsentation von LipA in verschiedenen <i>E. coli</i> Stämmen .....	80
Abbildung 16:	Western Blot-Analyse der LipA-EstA-Fusion .....	81

Abbildung 17: FACS-Analyse der oberflächenexponierten LipA-H Fusion .....	81
Abbildung 18: Photometrische Bestimmung der Aktivität der oberflächen- exponierten Lipase (LipA) durch Endpunkt-bestimmungen nach 15, 45 und 120 Minuten.....	83
Abbildung 19: Sensogramm der Bindung zwischen LipH und LipA.....	85
Abbildung 20: Untersuchung der Bindung von LipH an oberflächenexponiertes LipA durch Immunofärbung (LipH- Antikörper) und Analyse der Proben mittels FACS-Analyse .....	86
Abbildung 21: Zwei-Farben Markierungen von LipA präsentierenden <i>E. coli</i> Zellen mit und ohne Zugabe der Foldase LipH .....	89
Abbildung 22: Phage-ELISA-Analyse von zehn potentiellen LipH Bindern .....	90
Abbildung 23: Sequenzen der über Phage-Display selektierten LipH- bindenden VHH-Antikörper .....	91
Abbildung 24: SDS-PAGE nach Überexpression von VHH-LipH3AP (A) und VHH-LipH8AP (B) in <i>E. coli</i> JM109(DE3) pEZ-tet-SupE.....	92
Abbildung 25: Dot Blot-Analyse der Bindung von VHHLipH8AP an LipH.....	92
Abbildung 26: Sensogramm der Bindung zwischen VHHLipH8 und LipH .....	93
Abbildung 27: Kristallstruktur der Cutinase aus <i>Fusarium solani pisi</i> .....	96
Abbildung 28: Restriktionsanalysen der Cutinase CAST-Bibliotheken .....	99
Abbildung 29: Sequenzen für je drei Einzelklone der einzelnen Unter- bibliotheken A,B,C und D.....	99
Abbildung 30: Untersuchung der Expression der Cutinase Bibliotheken mittels FACS-Analyse.....	100
Abbildung 31: Untersuchung der lipolytischen Aktivität der Cutinase Bibliotheken.....	102
Abbildung 32: Untersuchung aktiver Einzelklone aus den verschiedenen Unterbibliotheken der CAST-Bibliothek .....	106
Abbildung 33: Funktionale Analyse der Aga2p-Fusionsproteine mittels Tributyrin-Festmedium .....	113
Abbildung 34: FACS-Analyse der auf Hefezellen exponierten lipolytischen Enzyme (Cutinase und <i>B. subtilis</i> Lipase).....	115

Abbildung 35: Mikroskopische Analyse der Oberflächenpräsentation und der Aktivität der Cutinase und <i>Bacillus subtilis</i> Lipase .....	115
Abbildung 36: Photometrische Bestimmung der Aktivität der auf Hefe exponierten Enzyme .....	117
Abbildung 37: Analyse der Aktivitätsmessung auf der Zelloberflächen mittels Mikroskopie .....	119
Abbildung 38: Aktivitätsmessung der oberflächenexponierten, lipolytischen Enzyme mittels FACS-Analyse .....	119
Abbildung 39: Mischungsexperiment: Sortierung eines Gemisches aus lipolytisch aktiven und inaktiven oberflächen-präsentierenden Hefezellen nach oberflächen gekoppelter Aktivitätsfärbung .....	121

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Subfamilien der Familie „wahren Lipasen“ (modifiziert nach Arpigny und Jaeger 1999) .....	4
Tabelle 2:	Anzahl der möglichen Varianten eines Proteins, in Abhängigkeit der Mutationen (M) .....	13
Tabelle 3:	Für <i>E. coli</i> beschriebene Oberflächensysteme zur Präsentation von Proteinen (modifiziert nach Rutherford und Mourez 2006 und Lee <i>et al.</i> 2003) .....	17
Tabelle 4:	Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und Hefestämme .....	35
Tabelle 5:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide .....	36
Tabelle 6:	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide .....	36
Tabelle 7:	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Gelelektrophorese .....	59
Tabelle 8:	Verwendete Nitrophenyl-Substrate mit zugehörigen Lösemitteln. ....	64
Tabelle 9:	Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immundetektion oberflächenpräsentierter Proteine auf <i>E. coli</i> .....	66
Tabelle 10:	Kinetik und Affinität der VHH-Antikörper gegen LipH mittels SPR-Analyse .....	93
Tabelle 11:	Unterbibliotheken für das CASTing der Cutinase .....	96
Tabelle 12:	Charakterisierung der Einzelbibliotheken .....	98
Tabelle 13:	Expressionsuntersuchung der Einzelbibliotheken mittels Fluoreszenzfärbung E-tag siehe auch (Abbildung 30) .....	101
Tabelle 14:	Apparente $E_{app}$ -Wert e der oberflächenexponierten Enzyme auf <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> .....	118
Tabelle 15:	FACS-basierte Hochdurchsatzverfahren zur Identifikation von veränderten Enzymvarianten (modifiziert nach Yang und Withers 2009) .....	141

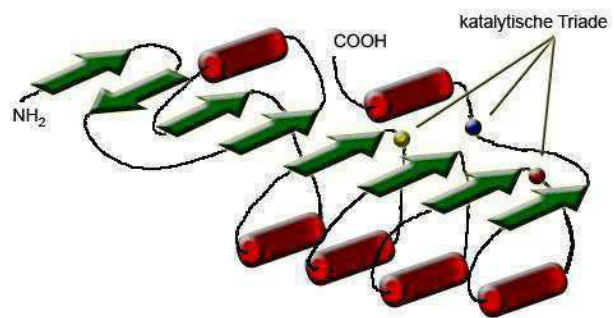


Auf Grund ihrer Fähigkeit, langkettige Acylglycerolester (länger 10 Kohlenstoffatome) zu hydrolysieren, werden Lipasen heute im Allgemeinen als Carboxylesterasen bezeichnet. Die Hydrolasen, die kürzere Acylglycerolester spalten, werden hingegen als Esterasen (3.1.1.1) bezeichnet. Diese Einteilung besitzt jedoch auch keine allgemeine Gültigkeit, da es auch hier Lipasen gibt, die neben langkettigen auch kurzkettige Ester hydrolysieren.

### 1.1.1 $\alpha/\beta$ Hydrolase Faltung und Mechanismus

Auf Grund ihrer 3D-Struktur gehören Lipasen zu den  $\alpha/\beta$  Hydrolasen. Sie besitzen ein konserviertes Faltungsmotiv, welches als *canonical  $\alpha/\beta$  hydrolase fold* bezeichnet wird (Ollis *et al.* 1992). Acht einzelne  $\beta$ -Faltblätter bilden die zentrale Struktur. Nur das  $\beta$ -Faltblatt 2 ist antiparallel angeordnet, die anderen verlaufen parallel und sind über  $\alpha$ -Helices miteinander verbunden (Abb. 2).

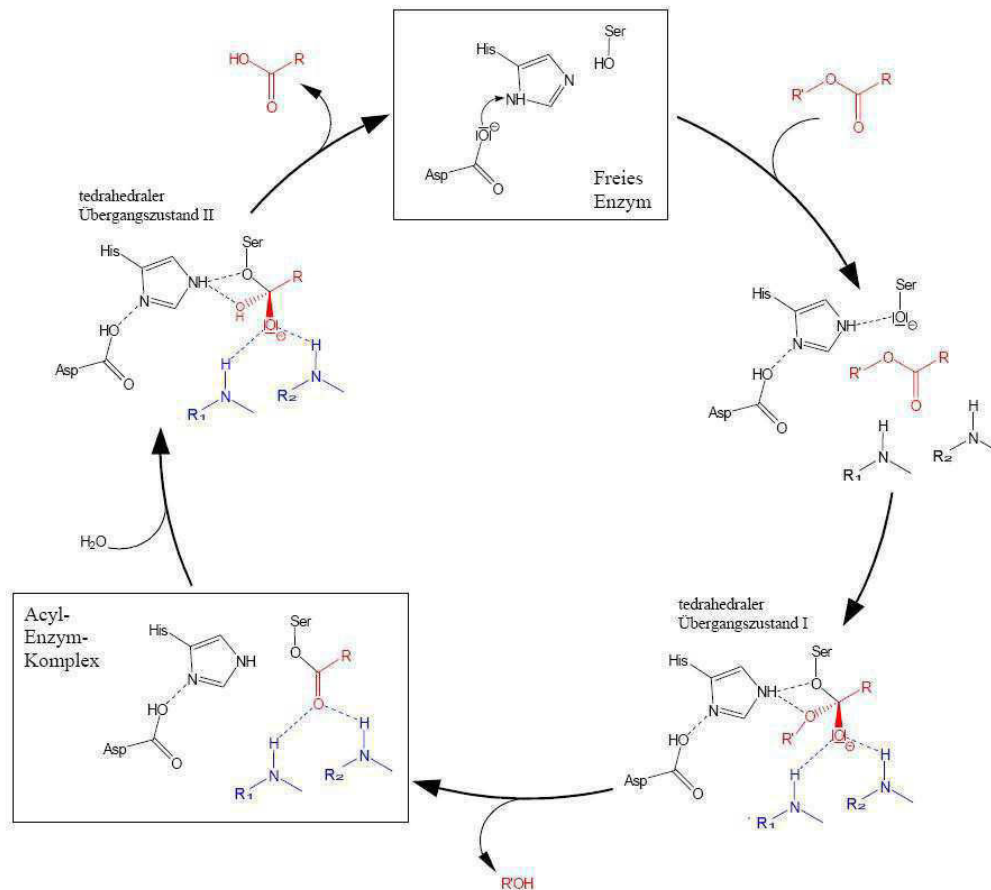
Die Hydrolyse von Estern durch lipolytische  $\alpha/\beta$  Hydrolasen, wie z.B. Lipase A und Esterase A aus *Pseudomonas aeruginosa*, Cutinase aus *Fusarium solani pisi* oder Lipase aus *Burkholderia glumae* erfolgt vergleichbar zu dem schon beschriebenen Mechanismus bei Serin-Proteasen (Dodson und Wlodawer 1998). Die katalytische Triade, bestehend aus einem nukleophilen



**Abbildung 2:  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold von Lipasen**  
 $\beta$ -Faltblattstrukturen sind als Pfeile und  $\alpha$ -Helices als Zylinder dargestellt. Die Lokalisierung der Aminosäuren der katalytischen Triade (nukleophile Serin (gelb), acide Aminosäure Asp/Glu (rot) und katalytisches Histidin His (blau)) sind als Kugeln gekennzeichnet modifiziert nach (Ollis *et al.* 1992).

Serin, einer aciden Aminosäure wie Aspartat oder Glutamat und einem katalytisch aktiven Histidin ist für die Hydrolyse entscheidend. Der genaue Katalysemechanismus ist in Abbildung 3 dargestellt. Das Substrat (rot) wird im katalytischen Zentrum der Lipase am Carbonyl-Kohlenstoffatom nukleophil durch das Seitenketten-Sauerstoffatom des katalytischen Serins angegriffen. Der tetrahedrale Übergangszustand I (Oxyanion) wird durch Rückgrat-Atome der beiden Aminosäuren (blau) stabilisiert, die die Oxyanion-Tasche bilden. Im Anschluss kommt es zur Abspaltung des Alkohols und der Acyl-Enzym-Komplex verbleibt. Dieser Schritt

zwischen Übergangszustand I und dem Acyl-Enzym-Komplex ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die gesamte Reaktion. Im Hydrolyseschritt greift nun Wasser oder ein anderes Nucleophil das Acylenzym an. Hierbei kommt es zur Ausbildung des tetrahedralen Übergangszustands II, welcher dann zur Abspaltung der Säure und zur Regeneration der freien Lipase führt.



**Abbildung 3: Mechanismus der katalytischen Triade von lipolytischen Enzymen**

In Rot dargestellt der Ester, in Blau nicht der katalytischen Triade zugehörige Aminosäuren, die bei der Koordination des Esters eine Rolle spielen.

### 1.1.2 Klassifizierung und Eigenschaften bakterieller Lipasen

Lipolytische Enzyme aus Bakterien werden nach ihren Eigenschaften und ihren Sequenzhomologien in acht Familien unterteilt. Hierbei spielen besonders die Lipasen der Pseudomonaden eine wichtige Rolle in der Einordnung der Enzyme, da diese zuerst erforscht wurden und überwiegend in industriellen Prozessen eingesetzt werden. Die erste Familie stellen die so genannten „wahren Lipasen“ dar. Diese werden nach Sequenzhomologien in sechs Subfamilien unterteilt (Tab. 1). Die Subfamilien I.1 und I.2 besitzen ein intermolekulares Chaperon, das so genannte Lif-



Protein, und werden über den Typ II-Mechanismus sekretiert. Die Lipasen der Subfamilie I.1 zeigen eine hohe Ähnlichkeit zur *Pseudomonas aeruginosa* Lipase. Die Lipasen der Subfamilie I.2 hingegen zeigen eine höhere Homologie zur *Burkholderia cepacia* Lipase. In der Subfamilie I.3 werden die Lipasen zusammengefasst, die kein Lif-Protein besitzen und deren Transport über den Typ I-Mechanismus stattfindet. Diese zeichnen sich des Weiteren durch eine höhere molekulare Masse aus (Arpigny und Jaeger 1999).

**Tabelle 1: Subfamilien der Familie „wahren Lipasen“ (modifiziert nach Arpigny und Jaeger 1999)**

Familie	Subfamilie	Enzyme aus Bakterienstamm	Accession Nr.	Sequenzhomologie [%]	
				Familie	Subfamilie
I	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	D50587	100	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> C9	AF031226	95	
		<i>Vibrio cholerae</i>	X16945	57	
		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	X80800	43	
		<i>Pseudomonas fragi</i>	X14033	40	
		<i>Pseudomonas wisconsinensis</i>	U88907	39	
		<i>Proteus vulgaris</i>	U33845	38	
	2	<i>Burkholderia glumae</i> *	X70354	35	100
		<i>Chromobacterium viscosum</i> *	Q05489	35	100
		<i>Burkholderia cepacia</i> *	M58494	33	78
		<i>Pseudomonas luteola</i>	AF050153	33	77
	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK W1	D11455	14	100
		<i>Serratia marcescens</i> *	D13253	15	51
	4	<i>Bacillus subtilis</i> *	M74010	16	100
		<i>Bacillus pumilus</i>	A34992	13	80
	5	<i>Bacillus stearothermophilus</i> *	U78785	15	100
		<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	X95309	14	94
		<i>Staphylococcus hyicus</i>	X02844	15	29
		<i>Staphylococcus aureus</i>	M12715	14	28
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AF090142	13	26
	6	<i>Propionibacterium acnes</i>	X99255	14	100
		<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	U80063	14	50

\* Lipolytische Enzyme mit bekannter 3D Struktur

### 1.1.3 Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten lipolytischen Enzyme

In den folgenden Kapiteln sollen die in der Arbeit verwendeten lipolytische Enzyme dargestellt werden. Hierbei nimmt die Esterase A (EstA) einen besonderen Stellenwert ein. Im Gegensatz zu den anderen hier erwähnten lipolytischen Enzymen wurde dieses membranständige Enzym nicht auf seine enzymatische Aktivität untersucht. Dieses lipolytische Enzym wurde in dieser Arbeit als Autotransporter für lösliche Enzyme verwendet, um eine Phänotyp-Genotyp Kopplung auf *E. coli* zu erreichen.

#### 1.1.3.1 Esterase A aus *Pseudomonas aeruginosa*

Die natürliche Esterase A (EstA) aus *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kann auf Grund ihrer katalytischen Triade, welche ein GDSLS-Konsensusmotiv um das katalytische Serin herum aufweist, der GDSL-Familie zugeordnet werden. Für diese Arbeit wurde eine inaktive Variante der Esterase verwendet und dient als Autotransporter für die im Weiteren beschriebenen lipolytische Enzyme. Hierzu wurde das aktive Zentrum deletiert (siehe auch 1.3.1.1.1) und die 24-Aminosäure-lange aminoterminalen Signalsequenz, welche für den Transport durch die innere Membran in das Periplasma von *Pseudomonas aeruginosa*, gegen die *E. coli* spezifische Signalsequenz (*phoA*) getauscht (Becker *et al.* 2005).

Das sekretierte Enzym besitzt eine molekulare Masse von 67000 (622 Aminosäuren) und ist untergliedert in eine aminoterminalen katalytischen Domäne und in einen carboxyterminalen Membrananker, welcher aus  $\beta$ -Faltblättern gebildet wird. Der Transportmechanismus der Esterase ist noch nicht komplett geklärt. Begründet durch diese Struktur und experimentelle Befunde kann EstA als Typ Va Autotransporter betrachtet werden. Im Jahr 2010 konnte EstA als erster Autotransporter in voller Länge kristallisiert werden (PDB ID: 3KVN) (van den Berg 2010). Dieser Autotransportertyp aus gram-negativen Bakterien ist vor allem aus der Sekretion von Virulenzfaktoren wie Invasinen, Adhesinen und Proteasen bekannt.

Die natürliche Funktion dieser Esterase ist noch nicht endgültig geklärt. Wilhelm *et al.* konnten in Mutationsstudien zeigen, dass EstA im Zusammenhang mit der Synthese von Rhamnolipiden steht. Diese führen zu Veränderungen in der Zusammensetzung der äußeren Membran, der Zell-Motilität und der Biofilmbildung, welche wiederum im Zusammenhang mit der Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa* steht. Auf

Grund dieser Verknüpfung zwischen EstA und der Pathogenität ist die Erforschung der Esterase als Zielmolekül für die Therapie von *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen interessant (Wilhelm *et al.* 2007a).

Die Esterase EstA konnte erfolgreich in *E. coli* Zellen exprimiert werden. Hierfür wurde die Signalsequenz für den Transport über die innere Membran gegen eine für *E. coli* bekannte Signalsequenz getauscht (Sec-Signalsequenz). Die sich durch den Autotransport an der Oberfläche befindende Esterase konnte bezüglich ihrer Enantioselektivität mit einem durchflusszytometrischen *high throughput* Verfahren evolutiv verändert werden. Hierbei wurde die Aminosäure W185 bei Sequenzanalysen identifiziert, welche dazu führt, dass es zu einer erhöhten Präferenz gegenüber dem R-Enantiomer des 2-Methyldekansäure-Esters kommt (Becker *et al.* 2008).

Neben der evolutiven Optimierung der Esterase wird der Autotransport-Mechanismus in der Biotechnologie und in dieser Arbeit verwendet, um Proteine auf der Oberfläche von Bakterienzellen zu präsentieren und somit eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung zu erhalten (siehe hierfür auch 1.3.1.1 Bakterielle Displaysysteme) (Becker *et al.* 2005).

#### **1.1.3.2 Lipase und deren spezifische Foldase bei *Pseudomonas aeruginosa***

Die bakteriellen Lipasen der Subfamilien I.1 und I.2 unterscheiden sich von anderen extrazellulären Lipasen im Vorhandensein einer Foldase, welche als LipH-Proteine oder auch als LipH in der Literatur bezeichnet werden. Die Lipase wird von dieser ihr spezifischen Foldase in den aktiven Zustand überführt. Die Faltung ist eng mit dem Transport der Lipase aus der Zelle verknüpft (Abbildung 4) und erfolgt im Periplasma, in das die inaktive Lipase über das Sec-System transportiert wird (El Khattabi *et al.* 2000). Neben der Faltung der Lipase durch LipH erfolgt die Knüpfung einer Disulfidbrücke durch das sogenannte Dsb-System (*disulfid bond formation*). Für die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass die Disulfidbrücke nicht für die Aktivität, jedoch für die Stabilität und die Anfälligkeit gegenüber Proteolyse im Periplasma eine entscheidende Rolle spielt (Brumlik *et al.* 1997; Urban *et al.* 2001 und Liebeton *et al.* 2000). Das aktive Enzym gelangt nun mittels des Xcp-Systems (TypII-Sekretion) ins extrazelluläre Medium.

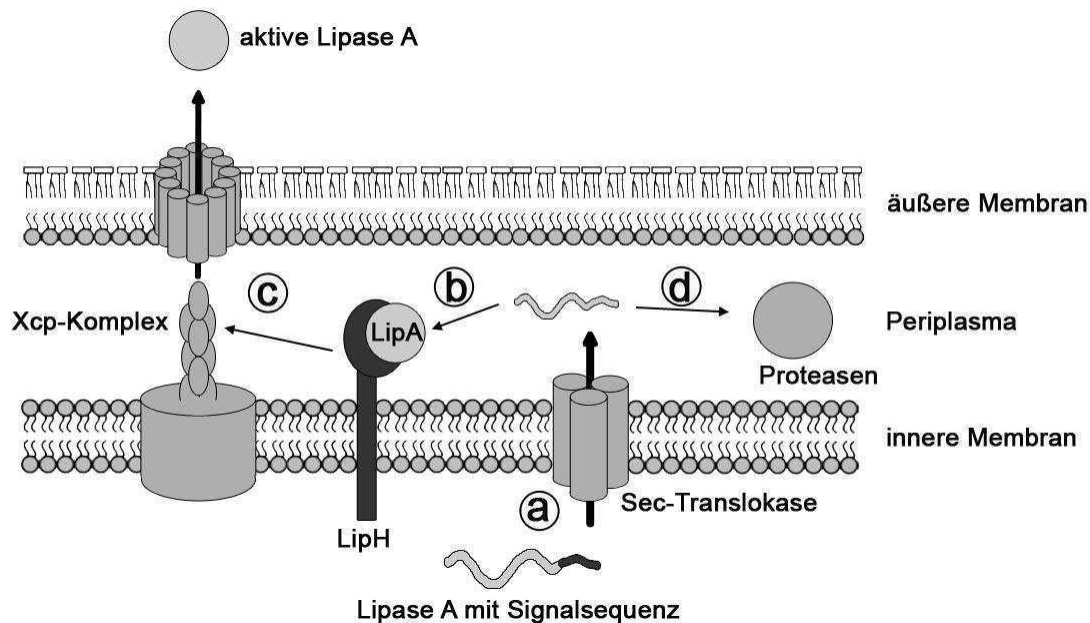


Abbildung 4: Faltung und Sekretion der Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa*

a) Die Lipase gelangt über den Sec-Translokase-Komplex, welcher die N-terminale Signalsequenz erkennt und abspaltet, in das Periplasma. b) Dort wird sie von ihrem Faltungshelfer gefaltet und es erfolgt die Ausbildung der Disulfidbrücken. c) Das aktive Protein gelangt über das Typ II Sekretionssystem aus dem Periplasma (bei *Pseudomonas aeruginosa* XCP-Komplex). d) Lipasen, die nicht in der korrekten Faltung vorliegen, werden durch im Periplasma vorliegende Proteasen degeneriert. (Modifiziert nach Rosenau *et al.* 2004)

Die Foldasen werden zusammen mit der Lipase in einem gemeinsamen Operon kodiert. Dieses unterliegt einem Zwei-Komponentensystem und ist von dem Transkriptionsfaktor  $\sigma^{54}$  abhängig. In Transkriptionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Foldase in einer geringeren Konzentration bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia glumae* gebildet wird. In Northern Blot-Analysen zeigte sich eine Degeneration der mRNA im Bereich der Foldase (Rosenau *et al.* 2004), (Frenken *et al.* 1993). Aus diesen Daten wurde für LipH auf einen Katalysator geschlossen. *In vitro* Studien zur Aktivierung konnten diese Annahme jedoch nicht bestätigen und zeigten eine 1:1 Stöchiometrie (Shibata *et al.* 1998; El Khattabi *et al.* 2000; Quyen *et al.* 1999). Des Weiteren lassen frühere Ergebnisse aus Rückfaltungsstudien sogar eine Stöchiometrie von Lipase zu Foldase in einem 1:4 Verhältnis vermuten (Ihara *et al.* 1995). Diese Daten lassen auf eine *single-turnover* Katalyse schließen. Weiter beschreibt Schneidinger (1997) eine Inhibition der aktiven Lipase nach Zugabe von gereinigter Lipase. Im Gegensatz zum Transport der Lipase ist der Mechanismus der Aktivierung nahezu unverstanden. Die Lipase aus *Burkholderia glumae* lässt sich im inaktiven und im aktiven Zustand nicht durch biophysikalische Methoden unterscheiden (El Khattabi *et al.* 2000). Der Komplex aus Lipase und Foldase ist sehr

stabil, so dass die Koimmunopräzipitation (Hobson *et al.* 1995), die chromatographische Reinigung *in vitro* formierter Komplexe oder Affinitätsblotting (Frank Rosenau 2001) möglich sind. Hierbei stellt sich die Frage, wie die Lipase von der Foldase dissoziiert, um dann sekretiert zu werden. Damit sich der Komplex aus Foldase und Lipase bilden kann, benötigt die Lipase Calcium für die Faltung (Shibata *et al.* 1998). Dieses lässt sich in der Struktur der *Pseudomonas aeruginosa* Lipasen im Inneren ausmachen (Nardini *et al.* 2000).

Neben der Kristallstruktur für LipA und LipH aus *Pseudomonas aeruginosa* konnte auch für den Komplex aus LipA und Lif von *Burkholderia glumae* eine Kristallstruktur erhalten werden (Accession codes. Protein Data Bank: 2ES4). Diese Strukturanalysen sowie weitere Daten aus UV-CD Spektroskopie zeigen, dass das LipH ohne LipA keine definierte Tertiärstruktur besitzt. Nach der Interaktion konnte ein Anstieg der  $\alpha$ -helicalen Strukturen gezeigt werden. Dies lässt darauf schließen, dass eine Änderung der Struktur der Foldase stattgefunden hat und sich durch die Interaktion im mittleren Bereich eine oder mehrere Helices ausgebildet haben. Dieser Prozess scheint die Lipase in die aktive Form zu überführen. Der in den Lif-Proteinen konservierte Bereich RxxFDY(F/C)L(S/T)A (wobei x jede Aminosäure darstellen kann), für den schon in Mutationsstudien gezeigt werden konnte, dass er für die Aktivierung wichtig ist, wurde der Mini-Domäne  $\alpha 1$  zugeordnet. Von den ersten 30 Aminosäuren nach dem Membrananker, welcher für die Kristallisierung nicht mit exprimiert wurde, konnte keine Modellierung erfolgen. Dieser Teil scheint flexibel bzw. unstrukturiert zu sein und fungiert wahrscheinlich als flexibler Spacer zur inneren Membran und ermöglicht möglicherweise die Interaktion mit dem Typ II-Sekretionskomplex (Pauwels *et al.* 2006). Zur näheren Charakterisierung der Aktivierung wurde die Foldase über das EstA-System auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung an den Membrananker keinen Einfluss auf die Aktivierung von LipA hat (Becker *et al.* 2007).

Neben dem Interesse an der Faltung der Lipase durch die zugehörige Foldase ist ein Augenmerk der Forschung die Enantioselektivität dieser Lipase. Die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* ist neben der Lipase A aus *Bacillus subtilis* und der Lipase B aus *Candida antarctica* eine der best untersuchtesten Lipasen. Hierzu wurde eine ganze Reihe von evolutiven Optimierung an diesem Enzym durch geführt (siehe hierzu 1.4).

### 1.1.3.3 Cutinase aus *Fusarium solani pisi*

Die Cutinasen stellen eine besondere Gruppe der lipolytischen Enzyme dar. Ihre Struktur ist sehr ähnlich zu den Lipasen. Im Gegensatz zu den meisten Lipasen besitzen sie keine Interphasen-Aktivierung und assoziieren nie mit der Lipid-Oberfläche. Sie besitzen keine Deckelstruktur. Auch in ihrem natürlichem Substrat, dem Cutin, unterscheidet sie sich.

Bei Triglyceriden zeigen Cutinase eine Präferenz gegenüber kurzkettigen Fettsäuren in einer Länge von 4–7 Kohlenstoffatomen. Die Cutinase aus dem Pilz *Fusarium solani pisi* ist ein 22 kDa großes Enzym, dessen dreidimensionale Struktur mit zu den ersten kristallisierten Lipasen gehörte (Martinez *et al.* 1992). Neben der wildtyp Cutinase mit verschiedenen Inhibitoren wurden eine Reihe von Cutinase Mutanten kristallisiert. Aus diesen Strukturen konnte eine Reihe an Aussagen über die Dynamik und die Substratbindung getroffen werden (Longhi und Cambillau 1999). Es konnte gezeigt werden, dass der aliphatische Teil des Triglycerids bei der Hydrolyse mit der Bindetasche interagiert. Die Acylketten hingegen kommen nicht mit der Proteinoberfläche in Berührung. Dies ist ein Grund für die nicht vorhandene Interphasen Aktivierung (Malcata 1996).

Durch die bekannte dreidimensionale Struktur und die schon bekannten Eigenschaften bezüglich der Dynamik und der Substratbindung stellt die Cutinase ein gutes Modell für die Optimierung der Enantioselektivität mittels direkter Evolution dar und wurde daher in dieser Arbeit für ein semirationelles Enzymdesign mittels CASTing (1.2.2.1) ausgewählt.

#### 1.1.3.4 Lipase A aus *Bacillus subtilis*

Die extracelluläre Lipase A aus *Bacillus subtilis* gehört als eine der kleinsten bekannten bakteriellen Lipase mit 19 kDa (181 AS) in die Unterfamilie 1.4 (Dartois *et al.* 1992), (Arpigny und Jaeger 1999). Sie gilt als „minimal“  $\alpha/\beta$  Hydrolase, da im Vergleich mit anderen Lipasen die ersten beiden  $\beta$ -Faltblätter fehlen und zum Teil Helices verkürzt sind (PDB ID: 1I6W). Im Weiteren weist sie keine Deckelstruktur und die damit verbundene Interphasen Aktivierung auf (van Pouderoyen *et al.* 2001). Die Klassifizierung als Lipase beruht auf ihrer Fähigkeit *sn*-1 und *sn*-3 Glycerinester mit langen Fettsäureresten zu hydrolysieren. Die höchste Aktivität besitzt die Lipase A bei Fettsäuren mit einer Kohlenstoffkettenlänge von acht C-Atomen (Dartois *et al.* 1992; Dartois *et al.* 1994), (Lesuisse *et al.* 1993), (Eggert *et al.* 2001).

Betrachtet man das für Lipasen typische Konsensusmotiv (Gly-X-Ser-X-Gly) weist die Lipase A ein unterschiedliches für *Bacillus* Lipasen typisches Konsensusmotiv auf (Ala-X-Ser-Gly) (Dartois *et al.* 1992), (Nthangeni *et al.* 2001). Biochemische Untersuchungen zeigen, dass die Änderung von Glycin zu Alanin im Konsensusmotiv einen Einfluss auf die pH-Stabilität der Lipase hat. Durch ihre physiologischen Eigenschaften, einem pI von 9,9 und zeigt Aktivität bis zu einem pH-Wert von 12 (Optimum pH 10) sowie bei einer Temperatur von 45 °C (Optimum 37 °C), ist dieses lipolytische Enzym sehr interessant für die Industrie (Eggert *et al.* 2001). Die Thermostabilität steht hierbei in unmittelbaren Zusammenhang mit dem vorhandenen pH-Wert. So hat eine pH Veränderung von pH 7 auf 5,5 einen großen Einfluss auf die Aktivität der Lipase nach Erhitzen. Während die Lipase bei einem pH Wert von 5,5 nach Erhitzen auf 55 °C für 20 Minuten und anschließendem Abkühlen wieder komplett aktiv vorliegt, ist das Enzym bei einem pH-Wert von 7 nach Erhitzen und abkühlen komplett inaktiv. Die Kristallstruktur der Lipase bei pH 5,5 sowie die Aggregation der Lipase bei pH 5,5 durch die Zugabe von Natriumchlorid weisen darauf hin, dass intra- und extramolekulare Interaktionen für die Rückfaltung eine wichtige Rolle spielen. Bei einem hohen pH führen der Verlust der Sekundärstruktur und Veränderung der hydrophoben Oberfläche zur Aggregation des Proteins. In verschiedenen Kristallstrukturen zeigt sich, dass die Lipase Dimere oder sogar lineare oligomer Strukturen ausbildet. Die oligomeren Strukturen sind in Kristallen bei

niedrigen pH konserviert, wobei ionische und hydrophobe Wechselwirkungen bei der Ausbildung eine Rolle spielen (Rajakumara *et al.* 2008).

Durch die physiologischen Eigenschaften und ihrer Größe ist die Lipase A aus *Bacillus subtilis* nicht nur eine interessante Lipase für industrielle Prozesse sondern auch in der Forschung, um Struktur-Funktionszusammenhänge aufzufindig zu machen.

Insbesondere die Thermostabilität des Enzyms findet hier besonderes Interesse. Durch gerichtete Evolution konnten verbesserte Varianten erhalten und diese durch Strukturinformationen charakterisiert werden. Die Strukturen zeigen, dass die Thermostabilität abhängig von Wasser-abhängigen ionischen Wechselwirkungen an der Oberfläche des Protein ist (Acharya *et al.* 2004), (Rajakumara *et al.* 2004), (Ahmad *et al.* 2008).

Die Lipase A aus *B. subtilis* ist nicht nur ein Modellenzym im Bereich Thermostabilität sondern auch in der gerichteten Evolution von Enzymen bezüglich der Enantioselektivität (siehe hierzu auch 1.4).

## **1.2 Protein Engineering**

Bakterielle Lipasen finden wie schon beschrieben auf Grund ihrer Eigenschaften Anwendung in der chemischen Synthese. Für die Optimierung der Lipasen ist *Protein Engineering* eine der Schlüsseltechnologien. Im Protein Engineering unterscheidet man zwischen zwei Vorgehensweisen, dem rationellen Proteindesign und der gerichteten Evolution (*directed evolution*).

### **1.2.1 Rationelles Protein Design**

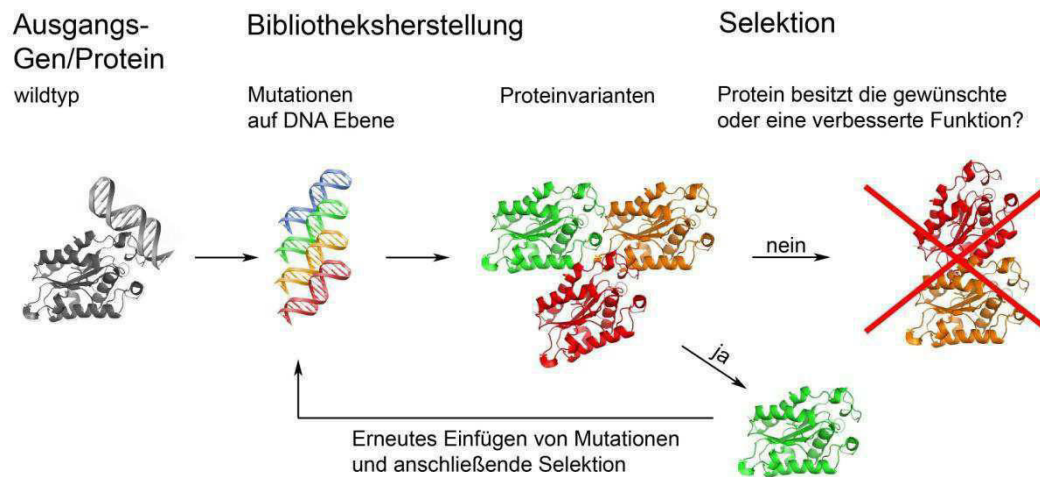
Im rationellen Design von Proteinen werden Vorkenntnisse über die Struktur und Reaktionsmechanismen genutzt. Über bioinformatische Vorhersagen werden bestimmte Positionen zur Randomisierung ausgewählt, die die gewünschte Funktion des Enzyms wichtig sind. Der Erfolg ist abhängig von einer genauen Kenntnis des Proteins, da jede Information über das Protein eine bessere Vorhersage erlaubt (Hult und Berglund 2003).

### **1.2.2 Gerichtete Evolution**

Bei der gerichteten Evolution sind keine besonderen Vorkenntnisse über das Protein notwendig. Das Protein wird wie in der Natur zufällig über bestimmte Techniken



(*error-prone* PCR, Mutations-Stämme, DNA-(*family*)-*shuffling* etc.) verändert. Im Anschluss wird auf die gewünschte Funktion des Moleküls selektiert (Jaeger *et al.* 2001). Abbildung 5 gibt einen schematischen Überblick über die für die gerichtete Evolution notwendigen Schritte.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung von der Durchmusterung von Protein-Bibliotheken**

Da bei diesem Ansatz im Gegensatz zum rationellen Proteindesign eine große Vielzahl an möglichen Varianten des Enzyms erhalten wird, ist die Entwicklung einer leistungsfähigen Methode zur Isolierung der Variante mit gewünschter Funktion notwendig.

Für die in dieser Arbeit verwendeten lipolytischen Enzyme soll im Folgenden die Anzahl der möglichen Varianten bei einer zufälligen Permutation der einzelnen Enzyme dargestellt werden, um die Vielzahl der möglichen Varianten zu verdeutlichen.

Die Anzahl der Varianten eines Enzyms berechnet sich für die zufällige Permutation wie folgt:

$$N = 19^M \cdot \left( \frac{X!}{M! \cdot (X-M)!} \right)$$

N = Anzahl der möglichen Varianten,

M = Anzahl der gleichzeitig ausgetauschten Aminosäuren pro Enzymmutante

X = Anzahl der Aminosäuren im Enzym

Aus den in dieser Arbeit verwendeten lipolytischen Enzymen resultieren für M = 1, ..., 4 die in Tabelle 2 gezeigten Varianten.

**Tabelle 2: Anzahl der möglichen Varianten eines Proteins, in Abhängigkeit der Mutationen (M)**

Anzahl Mutationen (M)	Cutinase ( <i>F. solani pisi</i> ) X = 214	Lipase A ( <i>B. subtilis</i> ) X = 181	Esterase A ( <i>P. aeruginosa</i> ) X = 622	Lipase A ( <i>P. aeruginosa</i> ) X = 311
1	4.066	3.439	11.818	5.909
2	8.227.551 ( $8 \cdot 10^6$ )	5.880.690 ( $6 \cdot 10^5$ )	69.720.291 ( $7 \cdot 10^7$ )	17.402.005 ( $2 \cdot 10^7$ )
3	11.046.858.476 ( $1 \cdot 10^{10}$ )	6.666.742.230 ( $7 \cdot 10^9$ )	273.768.342.660 ( $3 \cdot 10^{11}$ )	34.055.723.785 ( $3 \cdot 10^{10}$ )
4	11.071.713.907.571 ( $1 \cdot 10^{13}$ )	5.636.730.555.465 ( $6 \cdot 10^{12}$ )	804.947.369.506.065 ( $8 \cdot 10^{14}$ )	49.823.523.897.455 ( $5 \cdot 10^{13}$ )

Bei herkömmlichen Methoden (basierend auf Mikrotiterplatten oder Selektionsmedien) werden im Durchschnitt  $10^6$  Varianten bei einer automatisierten Selektion durchmustert. Diese umfasst, wie anhand der Beispiele in Tabelle 2 zu sehen ist, lediglich einen geringen Prozentsatz der eigentlichen Bibliothek (Yang und Withers 2009).

Aus diesem Grund ist die Entwicklung von leistungsfähigen Methoden ein Schwerpunkt der Forschung. Ein weiterer Ansatz ist die Einschränkung der Variantenanzahl durch semi-rationelle Verfahren. Ein Ansatz, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, ist das im folgendem beschriebene CASTing (Combinatorial Active-Site Saturation Test).

### 1.2.2.1 CASTing

Neben der Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren ist die Einschränkung der Bibliotheksgröße ein erfolgreiches Mittel zur Selektion veränderter Varianten. Hierzu werden Informationen über Struktur und Eigenschaften des Enzyms verwendet, um lediglich die Bereiche des Enzyms zu variieren, welche an der Funktion beteiligt sind. Eine Strategie für die Optimierung von Enzymen ist es nur die Aminosäuren zu randomisieren, welche an der Bindung des Substrats beteiligt sind. Dieser Methode wird als CASTing (Combinatorial Active-Site Saturation Test) bezeichnet und konnte erfolgreich für die evolutive Optimierung von Lipasen bezüglich ihrer Enantioselektivität etabliert werden (Reetz *et al.* 2005).

Bei der Verwendung von Enzymen in der organischen Chemie ist meist das Problem, dass das Enzym, welches die gewünschte Reaktion katalysiert, nicht das Substrat der

Reaktion akzeptiert. Hierfür gibt es in der Regel drei mögliche Ursachen: 1) das Substrat ist zu groß für die Bindetasche, 2) das Substrat besitzt die richtige Geometrie, um in der Tasche zu binden, ist jedoch zu klein um katalysiert zu werden und 3) das Substrat bindet, kann die Tasche jedoch nicht verlassen. In Anbetracht dessen ist es essentiell, die Bindetasche bei einer bekannten Struktur des Enzyms zu analysieren, um mögliche Aminosäurepositionen, welche in der Katalyse eine Rolle spielen, auszumachen. Hierzu wird das gewünschte Substrat in die Bindetasche modelliert und die Aminosäuren ausgemacht, welche direkt mit dem Substrat interagieren. Die Mutation der Aminosäuren erfolgt nicht einzeln sondern innerhalb der entsprechenden Proteinschleifen. Dadurch werden z.B. bei der Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* fünf Unterbibliotheken erhalten, die zwischen einer und drei Mutationen aufweisen (Reetz *et al.* 2005; Reetz *et al.* 2006).

In dieser Arbeit wurde das CASTings auf die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* angewendet, um die Anzahl der zu untersuchenden Varianten zu minimieren. Dieses Enzym bietet sich auf Grund der Vielzahl an Struktur Informationen für ein CASTing an.

### **1.3 Hochdurchsatzverfahren zur Durchmusterung von Enzym-Bibliotheken**

#### **1.3.1 Genotyp-Phänotypkopplung als Grundlage für Hochdurchsatzverfahren**

Ein Ansatz zur Selektion von Bibliotheken mit einer großen Variantenanzahl ist die Kopplung des Genotyps mit dem Phänotyp. Zur Durchmusterung großer Bibliotheken wurde eine Reihe von Display-Technologien entwickelt (z.B. mRNA-Display, Ribosomen-Display, Phagen-Display, bakterielles Display oder Hefe-Display). Diese Systeme beruhen auf einer replikationsfähigen Nukleinsäuresequenz, die eine Proteinvariante kodiert als Informationsträger (Genotyp) und einer direkten Verknüpfung der betrachteten Funktion (Phänotyp) mit dieser Information.

Neben den verbreiteten zellbasierten Systemen (*E. coli* und Hefe Display) wird zur Optimierung von Enzymen mittels Durchflusszytometrie auch die *in vitro* Kompartimentierung (*in vitro compartmentalization*) zur Phänotyp-Genotypkopplung verwendet. In einem von Wasser-in-Öl-Emulsion umhüllten Wassertropfen erfolgen alle für die Phänotyp-Genotypkopplung wichtigen Prozesse (Transkription, Translation, Enzymkatalyse, etc.) (Griffiths und Tawfik 2006). Bei all diesen Genotyp-Phänotyp-Systemen besteht die Herausforderung im Nachweis der gekoppelten Enzymaktivität und des damit verbundenen erfolgreichen Hochdurchsatzverfahrens.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Displaysysteme (*E. coli* und Hefe Display) sowie ihre Anwendung näher beschrieben. Zur Vollständigkeit wird im Anschluss ein Einblick in das Phage-Display gegeben, da dieses in der Literatur ebenfalls für die gerichtete Evolution von Lipase verwendet wurde.

##### **1.3.1.1 Bakterielle Displaysysteme**

Bakterielles Oberflächendisplay von Proteinen ist eine beliebte Technik in der Biotechnologie und bei industriellen Applikationen (Lee *et al.* 2003). Hierbei wird das Passagierprotein an ein Protein genetisch fusioniert, welches sowohl den Transport an die Oberfläche als auch die Verankerung an der Oberfläche vermittelt. Eine Vielzahl an Oberflächendisplay-Verfahren in Gram-negativen als auch Gram-positiven Mikroorganismen sind in den letzten Jahren beschrieben worden (Rutherford und Mourez 2006; Desvaux *et al.* 2006).

Bei Gram-positiven Bakterien erfolgt die Verankerung der Proteine mit der Zelle (a) über eine hydrophobe Transmembrandomäne in der Zytoplasmamembran, (b) über Lipoproteine, die kovalent an den Membranlipiden binden nachdem sie von der Signalpeptidase II gespalten wurden, (c) über ein C-terminales LPxTG-ähnliches Motiv, welches ein Signal für die Sortase ist, die das Protein kovalent an das Peptidoglycan der Zelle bindet oder (d) über spezifische Domänen, welche mit der Zellwand interagieren (Desvaux *et al.* 2006).

Bei Gram-negativen Bakterien muss das Protein zunächst über die innere Membran in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Hierzu werden das Sec-Transportsystem (sec) und das „*Twin arginine translocation*“-System (tat) verwendet. Die Insertion des Transportproteins erfolgt spontan oder mit Hilfe von speziellen Transportproteinen, wie z.B. Omp85. Für den Transport der Passagierproteine an die Oberfläche werden der Typ II, der Typ III sowie der Typ V. verwendet. Der Typ Va-Transport wird derzeit am häufigsten verwendet. Hierbei handelt es sich um monomere Autotransporter, welche sich nach Sekretion selbständig in die äußere Membran einlagern und eine Passagierdomäne an die Zelloberfläche bringen. Eine Übersicht der in der Literatur beschriebenen bakteriellen Systeme ist in Tabelle 3 dargestellt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Systeme zur Präsentation von Proteinen an der Oberfläche von *E. coli* ist das EstA-System. Diese Art der Präsentation wird im folgenden Unterkapitel genauer beschrieben.

Bei einem Vergleich des Autotransporters EstA mit vier weiteren Autotransporter (IgA Protease *Neisseria gonorrhoeae*; EstA from *Pseudomonas aeruginosa*; YpJ Autotransporter aus *E. coli* K12 (erst Verwendung); AIDA-I Adhesin *E. coli* O127:H27 Stamm 2787 und Protease EspP *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933) zeigten sich bezüglich der Überlebensrate und der Präsentation des Zielmoleküles deutliche Unterschiede. Als Zielmoleküle dient ein einkettiges, kurzes Protein (Anticalin), welches auf seine Bindung untersucht wurde. Das Fusionsprotein wurde unter der Kontrolle des *Tetracyclin*-sensitiven Promotor gestellt. Der Transport in das Periplasma erfolgte über die OmpA Signalsequenz. Die aktive Präsentation erfolgte mit allen fünf Autotransportern. Hier zeigten sich Unterschiede in der Überlebensrate, wie viele Moleküle präsentiert werden und wie viel Prozent dieser funktionell aktiv sind. Für das verwendete Anticalin stellte sich heraus, dass der Autotransporter EspP die beste

Überlebensrate und die beste Präsentation für das Molekül besaß. Der in dieser Arbeit verwendete Autotransporter EstA zeigte im Gegensatz zu den anderen Transportern eine vergleichbare Überlebensrate. In der funktionellen Untersuchung zeigte sich eine zweifach niedrigere Effizienz im Display (Binder *et al.* 2010).

**Tabelle 3: Für *E. coli* beschriebene Oberflächensysteme zur Präsentation von Proteinen (modifiziert nach Rutherford und Mourez 2006 und Lee *et al.* 2003).**

Transporter	Passagier	Applikation	Literatur
EspP* ( <i>E. coli</i> ) (450 AS/711 AS)	CtxB* ( <i>Vibrio cholerae</i> )	Translokationsstudien	(Skillman <i>et al.</i> 2005)
MisL* ( <i>S. enterica</i> ), (505 AS/955 AS)	StxB ( <i>Shigella dysenteriae</i> )	Vakzination	(Zhu <i>et al.</i> 2006)
	Epitop ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	Vakzination	(Ruiz-Pérez <i>et al.</i> 2002; Zhu <i>et al.</i> 2006)
AIDA-I* ( <i>E. coli</i> ), (440 AS/1287 AS)	Aprotinin (Rind)	Translokationsstudien	(Jose und Zangen 2005)
	OspG* ( <i>Borellia burgdorferi</i> )	Translokationsstudien	(Müller <i>et al.</i> 2005)
	Sorbitol Dehydrogenase ( <i>Rhodobacter sphaeroides</i> )	Enzymaktivität	(Kramer <i>et al.</i> 2003)
	UreA* ( <i>Helicobacter pylori</i> )	Vakzination	(Rizos <i>et al.</i> 2003)
	Epitop ( <i>Yersinia enterocolytica</i> )	Vakzination	(Kramer <i>et al.</i> 2003)
	Fragment von Invasin ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )	Oberflächendisplay von Proteinen	(Casali <i>et al.</i> 2002)
	Adrenodoxin (Rind)	Ganz-Zell-Katalyse von Steroiden	(Jose <i>et al.</i> 2002)
	$\beta$ Lactamase (bakteriell)	Translokationsstudien	(Lattermann <i>et al.</i> 2000)
	LTB* ( <i>E. coli</i> )	Translokationsstudien	(Konieczny <i>et al.</i> 2000)
	CtxB* ( <i>Vibrio cholera</i> )	Translokationsstudien	(Maurer <i>et al.</i> 1997)
	Synthetischer Proteaseinhibitor	Random screening	(Jose <i>et al.</i> 2005)
	MalE* ( <i>E. coli</i> )	Translokationsstudien	(Rutherford <i>et al.</i> 2006)
EstA ( <i>P. aeruginosa</i> ), (686 AS/686 AS)	Lipase A ( <i>Bacillus subtilis</i> )	Enzymaktivität	(Becker <i>et al.</i> 2005)
	Cutinase ( <i>Fusarium solani pisi</i> )	Enzymaktivität	(Becker <i>et al.</i> 2005)
	Lipase ( <i>Serratia marcescens</i> )	Enzymaktivität	(Becker <i>et al.</i> 2005)]
EstA (EstP) ( <i>P. putida</i> ) (325 AS/686 AS)	$\beta$ Lactamase (bakteriell)	Translokationsstudien	(Yang <i>et al.</i> 2004)
	Lipase A ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	Enzymaktivität	(Yang <i>et al.</i> 2004)

Transporter	Passagier	Applikation	Literatur
Ag43* ( <i>E. coli</i> ) (891 AS/1039 AS)	FimH* Lectin Domain ( <i>E. coli</i> )	Translokationsstudien	(Kjaergaard <i>et al.</i> 2002)
Ag43* ( <i>E. coli</i> ) (1039 AS/1039 AS)	Verschiedene Epitope	Vakzination	(Kjaergaard <i>et al.</i> 2002)
Ssp* ( <i>S. marcescens</i> ) (356AS/1045 AS)	Pseudo-Azurin ( <i>Alcaligenes faecalis</i> )	Translokationsstudien	(Shimada <i>et al.</i> 1994)
IgA Protease ( <i>N. gonorrhoeae</i> ) (440 AS/1505 AS)	Fos und Jun (Leucinezipper Domainen)	Translokationsstudien	(Veiga <i>et al.</i> 2003a)
	<i>Single-chain</i> Antikörper (ScFv)	Translokationsstudien	(Veiga <i>et al.</i> 1999)
	<i>Single-chain</i> Antikörper (ScFv)	Medikamenten Forschung	(Veiga <i>et al.</i> 2003b)
	CtxB ( <i>Vibrio cholerae</i> )	Translokationsstudien/ Vakzination	(Klauser <i>et al.</i> 1990) (Jose <i>et al.</i> 1996)
	$\beta$ Lactamase/ Trypsininhibitor	<i>Random screening</i>	(Wentzel <i>et al.</i> 1999)
	Metallothionein (Maus)	Enzymaktivität	(Valls <i>et al.</i> 2000)
Lpp-OmpA (121 AS/113 AS)	$\beta$ Lactamase (bakteriell)	Translokationsstudien	(Francisco <i>et al.</i> 1992)
	<i>Single-chain</i> Antikörper (ScFv)	Antikörper-Selektion mittels FACS	(Francisco <i>et al.</i> 1993a)
	Cex Exoglucanase ( <i>Cellulomonas fimi</i> )	Anhaftung und Hydrolyse von <i>E. coli</i> auf Cellulose	(Francisco <i>et al.</i> 1993b)
	Cex Cellulose Bindedomäne ( <i>Cellulomonas fimi</i> )	Anhaftung von <i>E. coli</i> auf Cellulose	(Francisco <i>et al.</i> 1993b)
	Organophosphorushydrolase	Biodegradation	(Richins <i>et al.</i> 1997)
	Phytochelatin	Adsorption	(Bae <i>et al.</i> 2000)
	PE DIII Antigen*, Extrazelluläre Domäne	Selektion von Phagen Antikörper	(Benhar <i>et al.</i> 2000)
Lpp-OmpA (121 AS/113 AS)	GFP	Untersuchungen zur Effizienz des Reporters	(Shi und Wen Su W 2001)
	Synthetische Peptide	Modell für Selektion mittels <i>E. coli</i> Display	(Bessette <i>et al.</i> 2004)
Omporf1, OmpU, oder Omp26La	GFP, MCP	Translokationsstudien	(Yang <i>et al.</i> 2008b)
verkürztes Intimin ( <i>E. coli</i> EHEC) (659 AS)	Trypsininhibitor ( <i>Ecballium elaterium</i> )	Translokationsstudien	(Wentzel <i>et al.</i> 2001)
	Interleukin 4	Translokationsstudien	(Wentzel <i>et al.</i> 2001)
	Bence Jones Protein (REI <sub>V</sub> )	Translokationsstudien	(Wentzel <i>et al.</i> 2001)

Transporter	Passagier	Applikation	Literatur
<i>Ice nucleation protein</i> ( <i>Pseudomonas syringae</i> ) (36 kDa)	Carboxymethylcellulase ( <i>Bacillus subtilis</i> )	Aktivität/ Gerichtete Evolution	(Jung <i>et al.</i> 1998b) (Kim <i>et al.</i> 2000)
	Levansucrase ( <i>Zymomonas mobilis</i> )	Enzymaktivität	(Jung <i>et al.</i> 1998a)
	Hüllproteine Hepatitis B Virus	Vakzination	(Lee <i>et al.</i> 2000) (Kim und Yoo 1999)
	Salmobin ( <i>Agkistrodon halys</i> )	Display von eukaryontischen Proteinen	(Jeong <i>et al.</i> 2001)
	Synthetisches Phytochelatin	Bioadsorbtion	(Bae <i>et al.</i> 2002)
	MerR*	Bioadsorbtion	(Bae <i>et al.</i> 2003)
	OPH*	Varianten-Selektion/ Biokatalyse	(Cho <i>et al.</i> 2002) (Xu <i>et al.</i> 2008)
	GFP	Translokationsstudien	(Li <i>et al.</i> 2004) (Xu <i>et al.</i> 2008) (Yang <i>et al.</i> 2008a)
VirG ( <i>Shigella</i> )	Methylparathionhydrolase	Biokatalyse	(Suzuki <i>et al.</i> 1995)
37 kDa	MalE* ( <i>E. coli</i> )	VirG Translokationsstudien	
PAL ( <i>E. coli</i> ) (173 AS)	PhoA*	VirG Translokationsstudien	(Suzuki <i>et al.</i> 1995)
	Anti-Atazin Antikörperfragment	Biosensor	(Dhillon <i>et al.</i> 1999)
SpA* Domäne B	GFP-K <i>ras</i>	Detektion einzelner AS- Austausche	(Aoki <i>et al.</i> 2002)
	GFP-p53 <sup>a</sup>	Detektion einzelner AS- Austausche	(Aoki <i>et al.</i> 2002)
TraT (26,5 kDa)	Hüllproteine Hepatitis B Virus	Vakzination	(Chang <i>et al.</i> 1999)
	Schlangengift Rhodostomin	Interaktionsstudien	(Chang und Lo 2000)
FliC (498 AS)	Adhäsive Domänen von FnBPA ( <i>Staphylococcus</i> ) und YadA ( <i>Yersinia</i> )	Expression adhäsiver Proteine	(Martineau <i>et al.</i> 1991)
FimH* (30 kDa)	Randomisierte Peptid-Bibliothek	Selektion auf Bindung	(Kjaergaard <i>et al.</i> 2000)
FimA (180 AS)	CtxB Epitop	Vakzination	(Stentebjerg-Olesen <i>et al.</i> 1997)
RsaA ( <i>Caulobacter crescentus</i> ) (1073 AS)	Fragmente des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> K Pilins	Keine Angabe	(Bingle <i>et al.</i> 1997)

\*Ag43: Antigen 43; AIDA-I: Autotransporter (*adhesin involved in diffuse adherence*); CtxB: Cholera toxin Untereinheit B; MCP (*major capsid protein*); EspP: extrazelluläre Serineprotease P; FimH: Adhäsine (*fimbrial adhesins*); FnBPA: Fibronektin-bindendes Protein A; LTb: Lymphotoxin-beta (tumor necrosis factor C); MalE: Maltose-Transporter Untereinheit; MerR: *Metalleregulatorische protein*; MisL: Autotransporter (*Salmonella enterica* serotype Typhimurium *fibronectin binding protein*); OPH: *Oxidized protein hydrolase*; OmpG: Proteinkinase; PE DIII: katalytische Domäne III Exotoxin *Pseudomonas aeruginosa*; PhoA: Alkalische Phosphatase, Ssp: Serineprotease/Autotransporter; StxB: Shigatoxin Untereinheit B; UreA: Urease; VirG (IcsA): Autotransporter (Virulenzfaktor); YadA: Adhäsine



### 1.3.1.1.1 Das Autotransportersystem der Esterase aus *Pseudomonas aeruginosa* zur Oberflächenpräsentation von lipolytischen Enzymen

Der Autotransportermechanismus der Esterase A (EstA) aus *Pseudomonas aeruginosa* lässt sich für die Zelloberflächenpräsentation von lipolytischen Enzymen verwenden (Abbildung 6). Hierzu musste zunächst eine inaktivierte Variante von EstA, im Weiteren als EstA\* bezeichnet, erzeugt werden. Dies sollte über einen Austausch des katalytischen Serins an Position 38 gegen Alanin realisiert werden. Bei der Mutation mittels SOE-PCR kam es hierbei jedoch zu einer Deletion von 156 Aminosäuren am aminoterminalen Ende. Dies betrifft die katalytische Domäne und führte zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Im Weiteren wurde zwischen das EstA\* und den späteren Passagierenzymen ein E-Epitop (GAPVPYPDPLEPR) in den Vektor ligiert, um eine weitere Möglichkeit zur Immunodetektion und zur Quantifizierung des oberflächenpräsentierten Proteins mittels FACS-Analyse zu erhalten. Für die Einbringung der zu präsentierenden Proteine wurden zwei *Sfi*-Schnittstellen in den Vektor eingebracht. Das Fusionsprotein wurde unter die Kontrolle des lac-Promotors kloniert. Für den Transport in das Periplasma wurde die *phoA*-Signalsequenz verwendet (Becker *et al.* 2005).

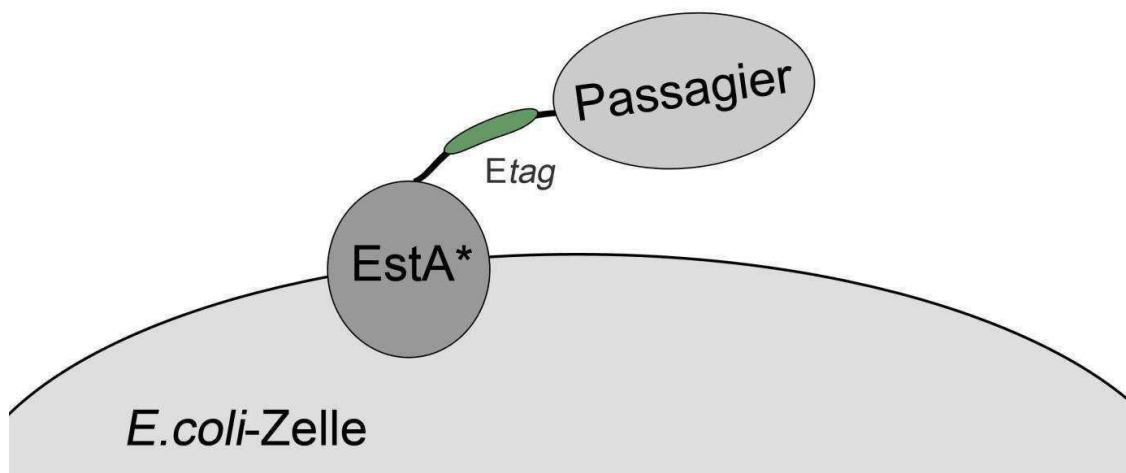


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Oberflächenpräsentation von Proteinen auf *E. coli*  
 Die schematische Darstellung erfolgt anhand des in dieser Arbeit verwendeten Konstrukts (siehe auch Becker *et al.* 2005). Für die Präsentation eines Passagier-Proteins wird dieses an den N-Terminus der inaktiven EsteraseA (EstA\*) fusioniert. Für die Detektion der Präsentation befindet sich zwischen der Esterase und dem Passagier ein E-Epitop (Etag), welche über kommerzielle Antikörper detektiert werden kann.

Dieses Prinzip der Oberflächenpräsentation ist bereits erfolgreich für *Fusarium solani pisi* Cutinase (214 AS), *Serratia marcescens* Lipase (613 AS) und *Bacillus subtilis* Lipase (181 AS) beschrieben worden. Alle drei Passagierenzyme weisen auf der Zelloberfläche von *E. coli* lipolytische Aktivität auf. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass das für EstA etablierte ESCAPED-Verfahren (1.3.2.1) auch bei diesen Enzymen möglich ist (Becker *et al.* 2005).

### 1.3.1.2 Hefe-Display

Hefe-Display ist eine gut etablierte Methode für die Identifikation von Proteinen mit veränderter Affinität, Spezifität und/oder Stabilität (Boder und Wittrup 1997). Ein Vorteil des Hefe-Displays im Vergleich zum bakteriellen Display ist, dass gewünschte Proteine gefaltet und glycosiliert über Exocytose an die Oberfläche gelangen. Wichtige Kontrollsysteme für die Präsentation von gefalteten Proteinen sind hierbei das UPR-System (*un*folded *pro*tein *re*sponse) und das ERAD-System (*e*ndoplasmatic *r*eticulum *a*ssociated *pro*tein *d*egradation) (Rakestraw *et al.* 2011).

Die Kopplung auf der Zelloberfläche erfolgt hierbei über Fusionen mit Ankerproteinen. Die meisten Systeme wurden für den Stamm *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt, aber auch Systeme in *Pichia pastoris* werden in der Literatur beschrieben (Su *et al.* 2009).

Eine Möglichkeit der Kopplung von Proteinen auf der Zelloberfläche ist über die beiden Untereinheiten des  $\alpha$ -Agglutinin (Aga1p und Aga2p) gegeben (Abbildung 7). Dieser Proteinkomplex ist als Zelladhäsionskomplex für den sexuellen Austausch von DNA in der Hefe *S. cerevisiae* wichtig. Durch die Interaktion der Proteine mit einander kommt es zu einer hohen und spezifischen Bindung zwischen den Hefezellen. Diese hoch spezifische Bindung erfolgt ebenfalls zwischen dem Fusionsprotein und dem Aga2p-Proteinanker und ist somit besonders geeignet für die Präsentation von Proteinen (Zhao *et al.* 2001).

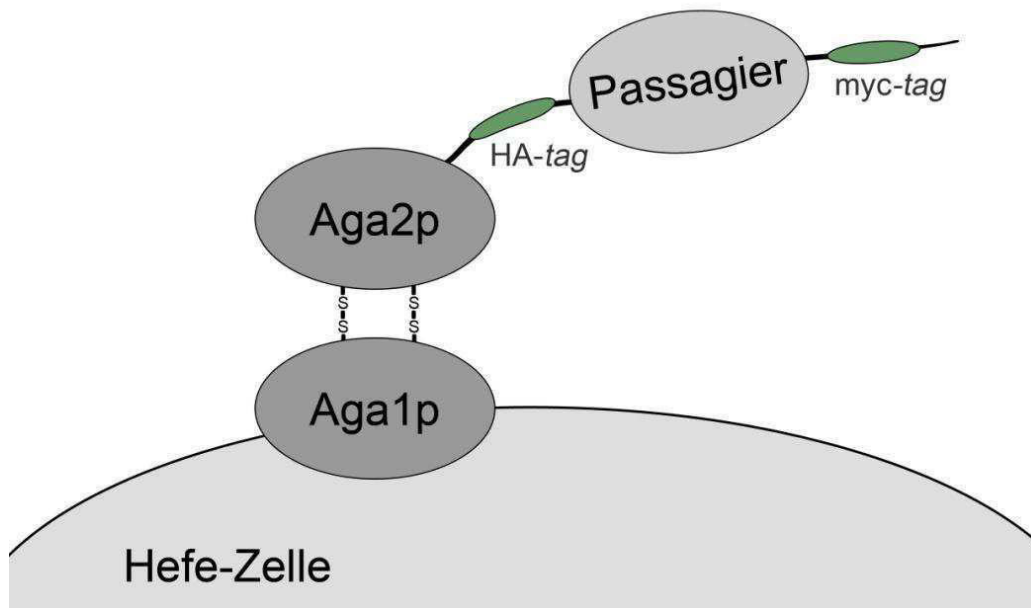


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Oberflächenpräsentation von Proteinen auf *Saccharomyces cerevisiae*

Die schematische Darstellung erfolgt anhand des in dieser Arbeit verwendeten Konstrukts (siehe auch Chao *et al.* 2006). Für die Präsentation eines Passagier-Proteins wird dieses an den C-Terminus von Aga2p fusioniert. Für die Detektion der Präsentation wird der Passagier von Epitopen flankiert, welche über kommerzielle Antikörper detektiert werden können (HA-tag (Hämagglutinin-Epitop); Myc-tag (Myc-Epitop)).

Für die Präsentation wird das Protein an die Aga2p Untereinheit des  $\alpha$ -Agglutinins fusioniert. Diese Fusion kann sowohl C- als auch N-terminal an das Aga2p erfolgen. Dieser Fusionskomplex wird unter Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors über ein Plasmid in die Hefezelle eingebracht. Die zweite Untereinheit Aga1p steht ebenfalls unter dem Galaktose-induzierbaren Promotor und ist in das Chromosom des verwendeten Hefe-Stamms integriert (Wittrup 2001).

Für das Display von lipolytischen Enzymen in dieser Arbeit wurden die Enzyme C-terminal an Aga2p fusioniert. Für den Nachweis der Expression auf der Oberfläche befindet sich am C-Terminus des zu präsentierenden Proteins ein Myc-Epitop, welches über einen kommerziell erhältlichen Antikörper nachweisbar ist (siehe hierzu auch Chao *et al.* 2006).

Mit dieser Art der Präsentation konnte schon die Meerrettich-Peroxidase erfolgreich auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Aktivität dieses Enzyms konnte über FACS-Analysen mittels einer Biotin-Tyramidreaktion, ähnlich dem ESCAPED-Verfahren, nachgewiesen werden. Hierzu wurden für die Analyse der Enantioselektivität der Peroxidase verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe an das Substrat gekoppelt. Es stellte sich in der weiteren Charakterisierung der Varianten heraus, dass dies einen Einfluss auf die Selektion hatte. Weiter zeigte sich, dass sich die Enantioselektivität zwischen auf der Zelle gebundenem und freiem Enzym unterschied. Die Enantioselektivität war löslich deutlich niedriger (Lipovsek *et al.* 2007; Antipov *et al.* 2008).

Eine weitere wichtige Anwendung für die Präsentation von Proteinen ist die Ganz-Zell-Katalyse. Für diese konnten die Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB) und die Lipase 2 aus *Yarrowia lipolytica* erfolgreich auf Hefezellen präsentiert werden. Für beide präsentierten Proteine zeigte sich eine erhöhte Stabilität. Dieser Effekt auf die Stabilität konnte auch für die alkalische Protease aus *Yarrowia lipolytica* gezeigt werden. In den Experimenten zeigt sich, dass der Membrananker einen Einfluss auf das Protein und seine Funktion hat. CalB zeigt auf der Oberfläche eine erhöhte Präferenz zu kürzeren Estern als das lösliche Enzym. Neben *S. cerevisiae* konnte für die Präsentation der Lipase B auch die Hefe *Pichia pastoris* verwendet werden (Tanino *et al.* 2006), (Kato *et al.* 2007), (Su *et al.* 2009), (Liu *et al.* 2010) und (Ni *et al.* 2009).

### 1.3.1.3 Phage-Display

Phage-Display ist eine gut etablierte Methode der Genotyp-Phänotypkopplung. Für die Kopplung werden filamentöse Phagen (Genus Inovirus) verwendet. Der *E. coli* infizierende Phage M13 ist hierbei der am besten untersuchte und am häufigsten verwendete in der Biotechnologie. Dieser zeichnet sich durch eine zirkuläre, einzelsträngige DNA aus. Das Virion besitzt eine längliche Struktur (6,5 nm x 930 nm) und kann sich in der infizierten Wirtszelle vermehren, ohne diese zu töten. Die Infektion erfolgt über den F-Pilus der *E. coli* Zellen und führt zu einem verlangsamten Wachstum der *E. coli* Kultur. Für die Präsentation von Proteinen und Peptiden auf dem Phagen M13 werden vor allem die Hüllproteine PIII und PVIII verwendet. Das PVIII-Protein ist das Hauptprotein des Phagen. Das PIII-Protein besitzt den Vorteil, dass es an der Spitze des Virions mit 3–5 Kopien vorliegt. Somit wird durch die Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche der Aufbau der Phagenhülle weniger gestört (Abbildung 8). Neben der Integration des Proteins in das Genom des Phagen finden insbesondere sogenannte Phagmide Anwendung. Das Phagmid enthält nicht das gesamte Genom des Phagens. Neben dem PIII-Fusionsprotein enthält das Phagmid den Replikationsursprung des Phagens, der das Verpackungssignal beinhaltet. Durch die Zugabe eines Helferphagen, welcher alle weiteren Informationen für die Phagenproduktion enthält, werden Phagen in *E. coli* produziert. Ein Vorteil dieses System ist, dass nun ein Gemisch aus wildtyp PIII Protein und PIII Fusionsprotein vorliegt. Das PIII Protein ist für das Anhaften des Phagens an den Bakterienpilus und der anschließenden Infizierung wichtig. Durch das Verwenden von Phagmiden bleibt somit die Infektiosität des Phagens auch bei größeren Fusionspartnern erhalten (Barbas 2001; Hoogenboom 2005 und Hoogenboom 2002).

Insbesondere für die Selektion von Bindern wird Phage-Display in der evolutiven Entwicklung von Proteinen erfolgreich eingesetzt. Die Selektion von Proteinen erfolgt wie in Abbildung 8 dargestellt in mehreren aufeinander folgenden Runden. Zunächst wird das Zielmolekül an ein Trägermaterial gebunden, im Anschluss wird die Phagenbibliothek zur Bindung hinzugegeben und gewaschen. Die gebundenen Phagen werden über Ligandenüberschuss oder pH-Änderung eluiert. Die eluierten Phagen werden nun zu *E. coli* Zellen gegeben, welche sie infizieren und sich nach Zugabe des

Helferphagen amplifizieren. Für die nächste Selektionsrunde werden diese amplifizierten Phagen aus dem Medium ausgefällt und verwendet.

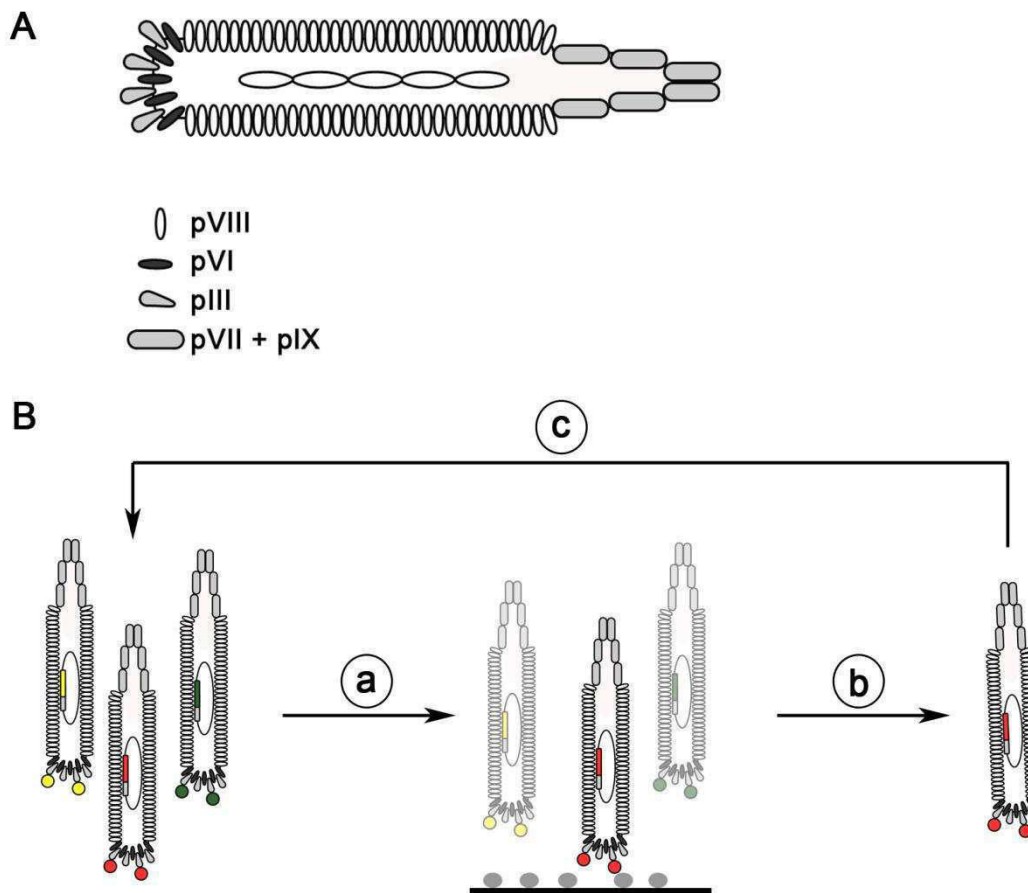


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Selektion von Bibliotheken über Phage-Display

A) Schematische Darstellung des Phagens M13, B) Übersicht der Selektion von einer Bibliothek über Phage-Display. a) Die Phagen-Bibliothek wird dem immobilisierten Zielmolekül zugegeben. Phagen, die nicht an das Zielmolekül binden, werden durch Waschen entfernt. b) Spezifisch gebundene Phagen werden eluiert. c) Die eluierten Phagen werden vermehrt und in weitere Selektionsrunden eingesetzt, bis eine signifikante Anreicherung erfolgt ist (in der Regel 3–4 Runden).

Für die Optimierung von Lipasen sind in der Literatur zwei Beispiele beschrieben. Für beide Selektionen wurde das Intermediat des Übergangszustands der gewünschten Reaktion verwendet. Dieses wird von der Lipase gebunden, wobei es nur zu einer verlangsamten oder zu keiner Freisetzung kommt. Die Gruppe um Danielsen *et al.* konnte keine aktiveren Varianten der Lipolase<sup>®</sup> aus *Thermomyces lanuginosa* erhalten. Nach jeder Runde konnte ein Anstieg der Aktivität im Phagengemisch detektiert werden. Bei der Untersuchung zeigten sich konservierte Mutationen, welche eine Homologie zu einer verwandten Lipase aus *Rhizopus delemar* aufwiesen. In der Analyse der einzelnen löslichen Varianten konnte jedoch keine erhöhte Aktivität

gezeigt werden. Die Vermutung, dass der Phagenpartikel einen Einfluss auf die Substrat-Enzym-Wechselwirkung hat, liegt hier nahe (Danielsen *et al.* 2001). Ein weiteres Beispiel ist die bei Dröge *et al.* beschriebene Optimierung der Lipase A aus *Bacillus subtilis* bezüglich ihrer Enantioselektivität. Hierbei konnten für die gewünschte Reaktion Varianten gefunden werden und für diese über Kristallstrukturanalysen mit dem Inhibitor Informationen gewonnen werden (Dröge *et al.* 2006).

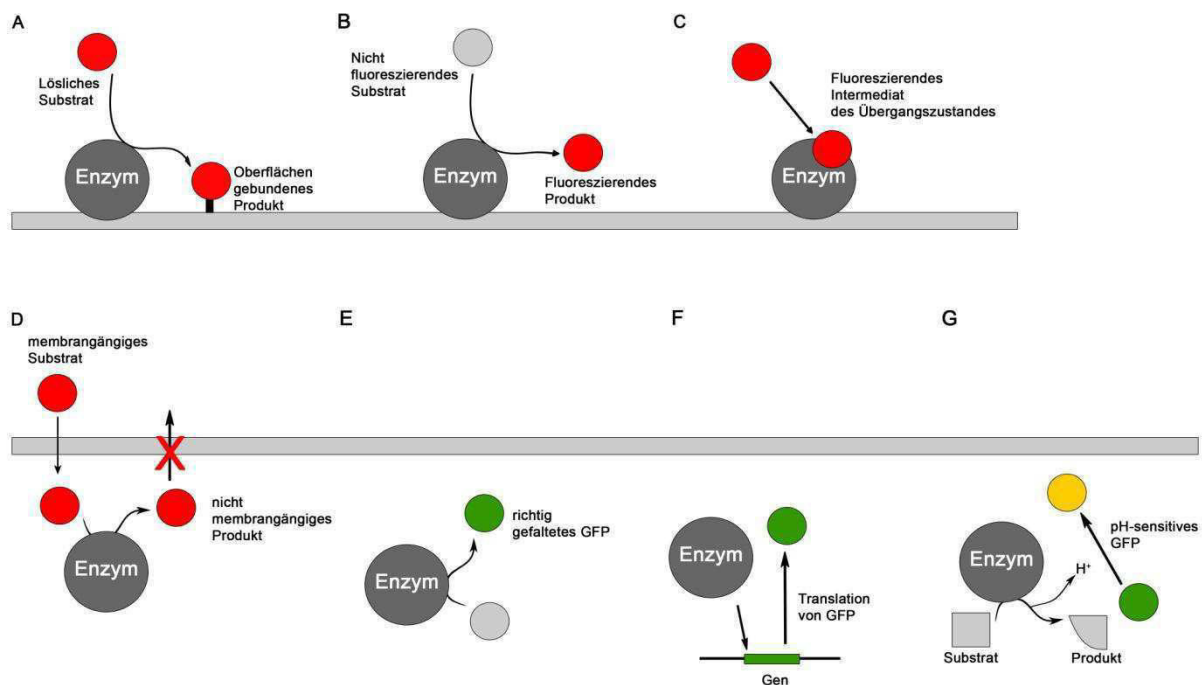
### 1.3.2 Durchmusterung von Enzym-Bibliotheken mit zellbasierter Durchflusszytometrie

Eine große Herausforderung für ein erfolgreiches Hochdurchsatzverfahrens ist die Entwicklung eines Nachweissystems der Enzymaktivität, welches eine schnelle und effektive Möglichkeit bietet die gewünschte Variante aus der Bibliothek zu selektieren. Ein Ansatz ist die Durchmusterung solcher Enzym-Bibliotheken mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS), welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Für die Durchmusterung muss die Enzymaktivität zunächst für das FACS sichtbar gemacht werden. Hierzu gibt es eine Reihe an Strategien, welche hier kurz vorgestellt werden. Auf die in dieser Arbeit verwendete Strategie, bestehend aus der Kopplung des Produkts auf die Zelloberfläche, wird im Folgenden ausführlich eingegangen.

Bei zellbasierten Systemen können drei Typen von Strategien unterschieden werden: 1.) Oberflächendisplay des aktiven Enzyms, 2.) das Enzym in der Zelle katalysiert aus einem membrangängigen Substrat ein Produkt, welches die Zelle nicht mehr verlassen kann und 3.) Nachweis der Enzymaktivität mit Grün-fluoreszierendem-Protein (GFP) und dessen Varianten.

Für die Phänotypkopplung auf der Zelloberfläche werden in der Literatur derzeit die folgenden drei Strategien beschrieben: A.) Das Substrat wird nach der Spaltung nicht kovalent oder kovalent an die Zelloberfläche gebunden, B.) durch die Spaltung eines nicht fluoreszierenden Substrats entsteht ein fluoreszierendes Produkt und C.) das fluoreszierende Substrat wird vom Enzym gebunden, da es dem Intermediat des Übergangszustandes entspricht (Abbildung 9 A-C)).

Eine weitere Möglichkeit der Genotyp-Phänotyp-Kopplung stellt die Expression des Enzyms und die Detektion der Enzymaktivität über ein Fluoreszenzsignal in der Zelle dar. Hier können zwei methodische Ansätze unterschieden werden. Zum einen die Verwendung von GFP und dessen Varianten als Reportermolekül für verschiedene enzymatische aber auch nicht enzymatische Reaktionen. Zum anderen werden membrangängige Substrate verwendet, welche in der Zelle durch das Zielenzym in ein Produkt umgesetzt werden. Auf Grund ihrer daraus resultierenden Polarität, Größe oder anderen chemischen Eigenschaften können diese nicht mehr aus der Zelle diffundieren (Abbildung 9 D).



**Abbildung 9: Strategien zur Kopplung der Enzymaktivität für die Analyse mittels FACS**

**A-C Methoden zur Kopplung der Enzymaktivität auf der Zelloberfläche.** A) Das Substrat wird nach der Spaltung nicht kovalent oder kovalent an die Zelloberfläche gebunden. B) Durch die Spaltung eines nicht fluoreszierenden Substrats entsteht ein fluoreszierendes Produkt. C) Das fluoreszierende Substrat wird vom Enzym gebunden, da es dem Intermediat des Übergangszustandes entspricht.

**D-G Methoden für die Selektion mittels FACS, bei denen sich das Signal in der Zelle befindet.** D) Das verwendete Substrat ist membrangängig und gelangt zum Enzym in die Zelle. Dort findet die Katalyse statt und es entsteht ein fluoreszierendes Produkt, welches auf Grund der Polarität, Größe oder anderen chemischen Eigenschaften nicht mehr aus der Zelle diffundieren kann. Die unter E-G dargestellten Strategien erfolgen über das Grünfluoreszierende-Protein (GFP). E) Für Chaperone wurde folgende Strategie in der Literatur verwendet: Durch das evolutiv veränderte Chaperon wird das nicht fluoreszierende GFP in die richtige Konformation gefaltet und beginnt zu fluoreszieren.

F) Die Aktivität des Enzyms ist mit der Expression von GFP gekoppelt. G) Eine pH-sensitive Variante von GFP wird verwendet, um den durch die Enzymaktivität entstehenden intrazellulären pH-Veränderung zu detektieren.

Einen Überblick der in der Literatur beschriebener zellbasierter Systeme für die Optimierung von Enzymen ist im Anhang dargestellt (Kapitel 6.2).



### 1.3.2.1 Kovalente Kopplung der Enzymaktivität auf der Zelloberfläche: Das ESCAPED-Verfahren

Die Kopplung der Enzymaktivität in oder auf der Zelle ist ein wesentlicher Punkt bei der Selektion von Enzymen. Für die evolutive Optimierung der Enantioselektivität von lipolytischen Enzymen konnte von Becker *et al.* (2008) erfolgreich das ESCAPED-Verfahren (*enzyme screening by covalent attachment of products via enzyme display*) für die Esterase A aus *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt werden. Zuvor konnte gezeigt werden, dass das Verfahren auch mit Passagierenzymen, welche durch die Esterase A an die Oberfläche von *E. coli* gebracht werden, funktioniert (Becker *et al.* 2007). Dieses Verfahren beruht auf der Oberflächenpräsentation des Enzyms auf *E. coli* Zellen und aktivitätsspezifischer kovalenter Zellmarkierung.

Bei der Spaltung des Substrats durch das lipolytische Enzym wird die phenolische Hydroxylgruppe des Tyramids frei. Dieses Produkt kann jetzt durch die chemisch auf der Zelloberfläche gekoppelte Meerrettich-Peroxidase in ein Radikal überführt werden. Das so aktivierte Produkt reagiert wie im Weiteren näher beschrieben mit der Zelloberfläche und es kommt zur Ausbildung der kovalenten Bindung auf der Oberfläche.

Die kovalente Bindung beruht auf einer in der Cyto- und Immunchemie zur Verstärkung des Signals verwendeten Technik (*Tyramide signal amplification*). Hierbei werden mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper verwendet. Die Signalamplifikation erfolgt über die Radikalisierung von Biotin-Tyramid-Konjugaten durch die Meerrettich-Peroxidase. Die entstandenen Radikale reagieren mit Tyrosinresten der Probe zu Dityrosinen. Die Entstehung des Dityrosins erfolgt unmittelbar, da Radikale durch das ungepaarte Elektron sehr reaktiv sind. Die kovalent gebundenen Biotin-Tyramid-Konjugate können durch Streptavidin-gekoppelte Fluorophore angefärbt werden (Bobrow *et al.* 1992; Chao *et al.* 1996 und Hunyady *et al.* 1996).

Für die Genotyp-Phänotypkopplung der Aktivität von Lipasen auf der Zelloberfläche wird die phenolische Hydroxylgruppe des Biotin-Tyramid-Konjugats mit einer Carbonsäure zum Ester verknüpft. Solange der Ester vorhanden ist, kann keine Radikalisierung erfolgen. Erst die Hydrolyse des Esters durch ein lipolytisches Enzym führt zur Bildung des Radikals durch die Meerrettich-Peroxidase und die

anschließende kovalente Kopplung des Biotin-Tyramid-Konjugats auf der Zelle. Die für die Reaktion notwendige Meerrettich-Peroxidase wird chemisch auf die Zelle gekoppelt und das für die Radikalbildung benötigte Wasserstoffperoxid zugegeben. Der Nachweis erfolgt über ein Streptavidin-gekoppeltes Fluorophor, welches an das Biotin (Reporter) des gekoppelten Substrats bindet. Für die Selektion auf Enantioselektivität wird neben Biotin für eines der Enantiomere eine zweite Markierung benötigt. Hierfür wird das Tyramid mit einem Di-Nitrophenyl-Rest verwendet, welcher über einen Antikörper detektiert werden kann. Die einzelnen Schritte der Markierungsreaktion sind in Abbildung 10 gezeigt.

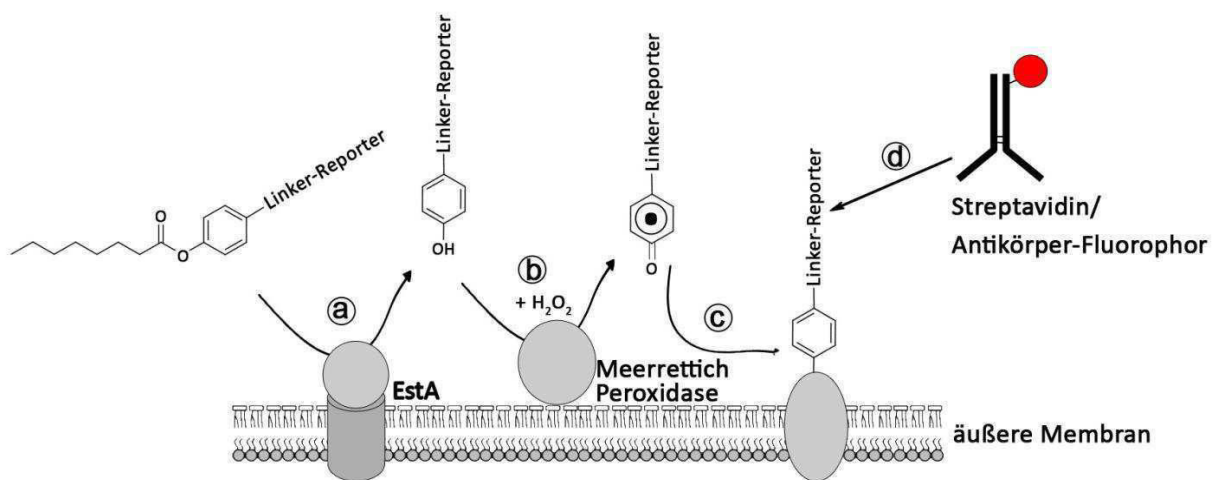


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Biotin-Tyramid-Reaktion

a) Hydrolyse des Esters durch ein lipolytisches Enzym, welches auf der Oberfläche von *E. coli* exponiert ist (als Beispiel ist in der Abbildung die Esterase A gezeigt). b) Die chemisch-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase überführt das Produkt der Esterhydrolyse (Tyramid) in ein Radikal. c) Das Radikal reagiert mit der Zelloberfläche und bindet kovalent an dieser. d) Nachweis des gebundenen Produkts über einen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper oder Fluoreszenz-gekoppeltes Biotin, welches an die entsprechende Reportergruppe (z.B. Biotin oder Di-Nitrophenyl) bindet.

## 1.4 Protein Engineering der Enantioselektivität bei Lipasen

Die Enantioselektivität von Lipasen findet in der Wissenschaft und der chemischen Industrie besonderes Interesse. Hierbei ist die Präferenz der Lipase für die enantioselektive Katalyse des Substrats entscheidend. Das Maß der Enantioselektivität ist hierbei der E-Wert, welcher angibt, um wie viel schneller das bevorzugte Enantiomer umgesetzt wird. Neben äußeren Einflüssen wie Reaktionstemperatur und Polarität des Lösungsmittels, spielen das Substrat und die Bindestelle eine entscheidende Rolle bezüglich der Enantioselektivität. Somit wird eine Bandbreite von

Substraten mit unterschiedlicher Enantioselektivität von Lipasen umgesetzt (Bornscheuer und Kazlauskas 2006).

Die inhärente Enantioselektivität  $E$  lässt sich experimentell durch die drei folgenden Gleichungen ermitteln, wobei  $ee_p$  den Enantiomerenüberschuss des Produkts,  $ee_s$  den Enantiomerenüberschuss des Substrats und  $c$  den Umsatz angibt (Chen *et al.* 1987):

$$E = \frac{\ln [1 - c(1 + ee_p)]}{\ln [1 - c(1 - ee_p)]}$$

$$E = \frac{\ln [(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln [(1 - c)(1 + ee_s)]}$$

$$E = \frac{\ln \left[ \frac{1 - ee_s}{1 + \frac{ee_s}{ee_p}} \right]}{\ln \left[ \frac{1 + ee_s}{1 + \frac{ee_s}{ee_p}} \right]}$$

Für den Umsatz ( $c$ ) ergibt sich:

$$c [\%] = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} * 100$$

Während des gesamten Reaktionsverlaufes bleibt die inhärente Enantioselektivität konstant. Sie hängt lediglich von der Umgebung des Systems ab.

Die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* ist ein Modell für die gerichtete Evolution von Proteinen bezüglich ihrer Enantioselektivität. Hierbei wurde die Lipase durch verschiedene Mutagenese-Techniken verändert und über photometrische Aktivitätstests in Mikrotiterplatten charakterisiert. Das wildtyp Enzym zeigt in Bezug auf 2-Methyldekansäure keine Präferenz gegenüber einem der Enantiomere ( $E_s = 1,1$ ). In ersten Mutationstudien konnte über *error prone* PCR ein deutlich verbesserter Umsatz des S-Enantiomers erreicht werden ( $E_s = 11,3$ ;  $ee = 81 \%$ ). Die verbesserte Variante besaß 5 Mutationen (V47G, V55G, S149G, S155F und S164G), vier der Aminosäureaustausche zu Glycin (Jaeger und Reetz 2000). An anderen Lipasen konnte gezeigt werden, dass Glycin in der Flexibilität der Lipase eine entscheidende Rolle spielt (Holmquist *et al.* 1997), (Holmquist 1998), (Peters *et al.* 1997) und (Peters *et al.* 1999). Über mehrere Runden wurde die Präferenz weiter verbessert, so dass die beste Variante einen  $E_s = 51$  aufwies. Einen Überblick über die verwendeten einzelnen Runden und die verwendeten Techniken zeigt Abbildung 11. Die Variante (LipA<sub>x</sub> oder LipA<sub>1H8</sub>) mit dem besten E-Wert zeigte hierbei sechs Aminosäureaustausche (D20N, S53P, S155M, L162G, T180I und T234S). Die Austausche an den Positionen 53 und 162 sind von der größten Bedeutung für die

Umorganisation der Substratbindestelle. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch an Position 53 zu einer Umorganisation der Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum führt. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Position des Histidins an der Position 83. Die Aminosäure an Position 162 steht in unmittelbarer Nähe der Substratbindestelle. Zur Analyse wurden die Einzel-, Doppel und Trippelmutanten der Variante hergestellt. Hierbei bestätigte sich die Rolle der beiden Aminosäuren für die Enantioselektivität. Bei der Doppelmutante mit S53P und L162G erhöhte sich der E-Wert auf 64. Im nächsten Schritt wurden die aus den Varianten gewonnen Erkenntnisse für weitere gezielte Punktmutationen an Position 83 verwendet. Hierbei konnte keine Verbesserung gezeigt werden (Reetz *et al.* 2007).

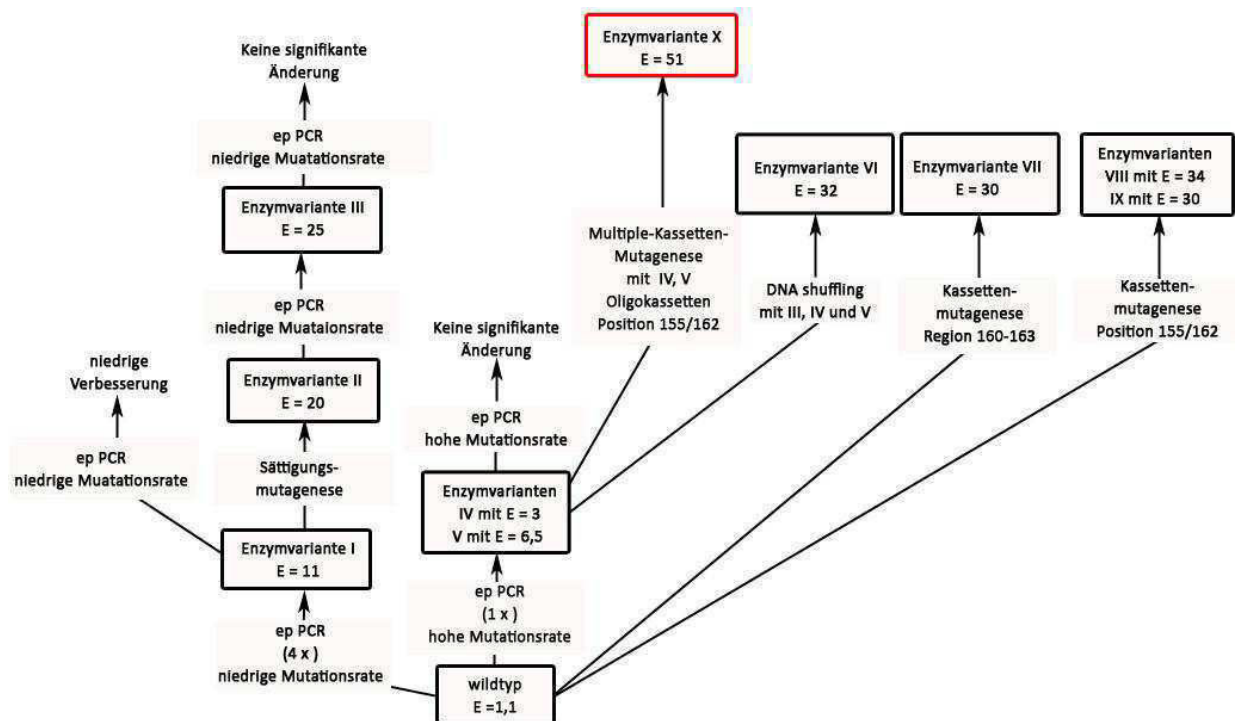


Abbildung 11: Überblick über die Optimierung der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa*. (modifiziert nach Reetz *et al.* 2007)

Auch das unter 1.2.2.1 beschriebene CASTing wurde für diese Lipase verwendet. Als Ester wurde nicht Methyldekansäureester verwendet, sondern es wurden als Substituenten des Esters verzweigte, aromatische und überbrückte Kohlenstoffe verwendet. Für Substrate, die das wildtyp Enzym nicht umsetzte, konnten aktive Varianten gefunden werden (Reetz *et al.* 2005; Reetz *et al.* 2006).

Ein zweites Modellsystem für die enantioselektive Optimierung von Enzymen ist die Lipase A aus *Bacillus subtilis*. Für die Hydrolyse von asymmetrischen *meso*-1,4 Diacetoxy-2-Cylopenten zur Herstellung von chiralen Alkoholen wurde die Lipase A

aus *Bacillus subtilis* evolutiv optimiert. Die Selektion erfolgte hierbei über ESI-MS (*electrospray ionisation mass spectrometry*). Da die Reaktion keiner kinetischen Resolution unterliegt, kann eine Konversion von 100 % erreicht werden. Das wildtyp Enzym besitzt einen ee-Wert von 38 % (1R, 4S). Durch die Durchmusterung einer Sättigungsbibliothek konnten veränderte Varianten gefunden werden, die einen ee-Wert von 65 % (1S, 4R) bzw. für die invertierter Enantioselektivität einen ee-Wert von 88 % (1R, 4S) aufweisen (Funke *et al.* 2003; Jaeger und Eggert 2004). Ein weiteres Substrat, für das eine evolutive Optimierung erfolgte, ist (R/S)-1,2-O-Isopropyliden-*sn*-Glycerol (IPG), welches ein Vorläufermolekül für die Herstellung eines adrenergen  $\beta$ -Rezeptor-Antagonisten ist. Hierfür wurden zwei Systeme für die Selektion beschrieben. Das erste System ist ein Phage-Display basiertes System (siehe hierzu 0), das zweite System besteht aus einem Überlebensassay in *E. coli*. Für diesen Überlebensassay wurde ein Aspartat autotropher *E. coli*-Stamm verwendet und als Substrat für die Lipase (R/S)-IPG-Aspartat. Um eine enantioselektive Variante zu erhalten, wurde das Aspartat nur an eines der Enantiomere gekoppelt. Das zweite Enantiomer wurde das entsprechende Substrat als Phosphonat-Inhibitor (((R/S)-2,2-Dimethyl-1,3-Dioxan-4-yl)methyl-4-Nitrophenylbutylphosphonat) eingesetzt. Durch die verwendeten Substrate konnten nur die *E. coli*-Klone wachsen, bei denen die Lipase-Mutante den Aspartatester am entsprechenden IPG hydrolysieren konnte. Wenn die Variante jedoch auch das andere Enantiomer umsetzte, wurde es durch den Phosphonatinhibitor inhibiert, so dass es auch das überlebenswichtige Substrat nicht mehr umsetzen konnte.

Die gefundenen Varianten zeigen nach der zweiten Selektionsrunde einen Austausch in der katalytischen Triade. Das Aspartat ist gegen eine Reihe von anderen Aminosäuren ausgetauscht. Der Befund, dass das Aspartat austauschbar ist, zeigte sich auch in anderen wildtyp Lipasen wie z.B. der Phospholipase A<sub>2</sub>. Der Austausch des Aspartats führt zu einer verminderten Aktivität (Boersma *et al.* 2008).

Ein weiterer Ansatz zu Klärung von Struktur-Funktions-Beziehungen bezüglich der Enantioselektivität besteht darin verschiedener Enzyme untereinander zu vergleichen. Eine experimentelle Arbeit hierzu wurde für die *Bacillus subtilis* Lipase von Boersma *et al.* durchgeführt. Hierbei wurde eine Schleife am aktiven Zentrum durch die entsprechende Schleife anderer lipolytischer Enzyme (Cutinase aus *Fusarium solani*

*pisi*, Acetylxyloxy-Esterase aus *Penicillium purpurogenum*) ausgetauscht. Der Austausch der Schleifen führt bei Erhalt einer Konversion zu einer Inversion der Enantioselektivität gegenüber IPG, so dass diese Varianten das S-Enantiomer präferieren (LipA<sub>wt</sub> ee = -12,9 %; LipA<sub>Cutinase</sub> ee = 26,4 %; LipA<sub>Esterase</sub> ee = 6 %; Cutinase<sub>wt</sub> ee = 40,5). Um die Enantioselektivität der Lipase weiter zu verbessern, wurde an der Aminosäure L21 eine Sättigungsmutagenese durchgeführt. Mit den zwei Varianten (L21G und L21Q), welche die beste Konversion und Enantioselektivität zeigten, wurde eine weitere Sättigungsmutagenese an Position T20 durchgeführt. Die beste erzeugte Variante (T20K, L21G) besaß einen ee = 67,7 %.

Die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* und die Lipase A aus *Bacillus subtilis* können als Modell-Enzyme für die gerichtete Evolution bezüglich der Enantioselektivität gesehen werden. Weitere in der Literatur beschriebene lipolytische Enzyme, die evolutiv bezüglich ihrer Enantioselektivität verändert wurden, sind die Esterase A aus *Pseudomonas aeruginosa* (siehe hierzu auch 1.1.3.1 und 1.3.1.1.1), die Esterase aus *Bacillus subtilis* (Bartsch *et al.* 2008), die Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) (Reetz *et al.* 2008) und die der Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* verwandte Lipase A aus *Burkholderia cepacia* KWI-56 (Koga *et al.* 2007).

## 1.5 Zielsetzung

Lipolytische Enzyme sind auf Grund der von ihnen katalysierten Reaktionen wichtiger Bestandteil industrieller Prozesse (Jaeger und Reetz 1998). Da die gewünschten Reaktionen nicht immer durch natürlich vorkommende Enzyme katalysiert werden, ist die evolutive Optimierung von Enzymen ein wichtiges Mittel, um Enzyme für diese industriellen Anwendungen zu finden.

Diese Arbeit hat zum Ziel, ein robustes Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung und Isolierung von lipolytischen Enzymvarianten mit veränderter Substratspezifität zu etablieren.

Das Hochdurchsatzverfahren soll eine Weiterentwicklung des ESCAPED-Verfahren darstellen (1.3). Für die Genotyp-Phänotyp-Kopplung der lipolytischen Enzyme wurden zwei Ansätze verfolgt:

- 1) Oberflächenpräsentation auf *E. coli* Zellen über die Membranesterase (EstA) aus *Pseudomonas aeruginosa*

- 2) Oberflächenpräsentation auf *Saccharomyces cerevisiae* Zellen über  $\alpha$ -Agglutinin

Auf der Oberfläche der beiden Systeme sollen die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* (1.1.3.2), die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* (1.1.3.3) und Lipase A aus *Bacillus subtilis* (1.1.3.4) präsentiert werden.

Die Isolierung der Varianten soll auf spezifischer Zellmarkierung beruhen, dem ESCAPED-Verfahren (1.3.2.1). Hierbei soll zunächst der Fokus auf dem schon etablierten *E. coli* System liegen. Dieses System auf *E. coli* soll im Weiteren auf *Saccharomyces cerevisiae* übertragen werden. Für das System auf *E. coli* sollen neben der näheren Charakterisierung des Hochdurchsatzverfahrens eine CAST-Bibliothek (1.2.2.1) erstellt und Varianten mit geänderter Enantioselektivität mittels des ESCAPED-Verfahrens selektiert werden.

Für das System auf Hefen soll das ESCAPED-Verfahren auf *Saccharomyces cerevisiae* Zellen über  $\alpha$ -Agglutinin etabliert werden. Neben der näheren Charakterisierung des adaptierten Hochdurchsatzverfahrens soll anhand eines Modellanreicherungs-experiments das Verfahren erprobt werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Bakterienstämme, Hefestämme, Oligonukleotide und Plasmide

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und Hefestämme

Art	Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
<u>Escherichia coli</u>	JM 109(DE3)	F' [traD36, proAB+, lacIq, lacZ ΔM15] endA1 recA1 hsdR17 thi-I mcrA supE44 gyrA96 relA1 Δ(lac-proAB) (DE3)	Firma Promega
	BL21(DE)	F' ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm+ Tetr (DE3) endA	(Studier und Moffatt 1986)
	Origami(DE3) pLysS	F' ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm lacY1 aphC (DE3) gor522::Tn10 trxB pLysS	Firma Novagen
	DH5α	supE44 Δ lacU169(Δ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-I relA1	(Hanahan 1983)
	JK321	ΔompT proC leu-6 trpE38 enrA zihl2: :TnlO dsbA: :kann	(Jose <i>et al.</i> 1996)
	XL-1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacqZ_M15 Tn10 (TetR)]	Firma Stratagen
<u>Saccharomyces cervicae</u>	EBY100	(trp1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS2 prbΔ1.6R can1 GAL	(Boder und Wittrup 1997)



Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Referenz
pEst100-Cut	(Becker <i>et al.</i> 2007)
pEst100-LipH	(Wilhelm <i>et al.</i> 2007b)
pEst100-LipA	Diese Arbeit
pET22LipA	(Funke <i>et al.</i> 2003)
pMAC5-8FSP	(Lauwereys <i>et al.</i> 1991)
pLipASS	(Sascha Hausmann 2008)
pEHTHis19	(Sascha Hausmann 2008)
pAC200	(Habicht <i>et al.</i> 2007)
pTET (pGH-AP)	(Habicht <i>et al.</i> 2007)
pCT	(Boder und Wittrup 1997)
pCT-Cut	Diese Arbeit
pCT-BsLipA	Diese Arbeit

Tabelle 6: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	verwendet zur Konstruktion von
PA-LipASfi up	GTCCTCGCAACTGCGGCCCGCCGATGAGCACCT ACACCCAGACCAAATAC	Klonierung von LipA in pEst100-Vektor zur Oberflächenpräsentation
PA-LipASfi low	GCGTTTCTGGGTGGGCCCCGAGGCCGACAGGCTGG CGTTCTTCAGGCG	Klonierung von LipA in pEst100-Vektor zur Oberflächenpräsentation
Cutinase Sfi up	GTCCTCGCAACTGCGGCCCGCCGATGCTGCCTA CTTCTAACCCTG	Klonierung der CAST- Bibliotheken
Cutinase Sfi low	GCGTTTCTGGGTGGGCCCCGAGGCCGAAGCAGAAC CACGGACAGCC	Klonierung der CAST- Bibliotheken
Cutinase Hefe up	GGTGGTGGTGGTTCTGCTAGCCTGCCTACTTCTAACC	Klonierung der Cutinase in den Hefe-Display-Vektor pCT
Cutinase Hefe low	ATAAGCTTTTGTTCGGATCCAGCAGAACCACGGACAG CC	Klonierung der Cutinase in den Hefe-Display-Vektor pCT

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	verwendet zur Konstruktion von
Bs Hefe up	GGTGGTGGTGGTTCTGCTAGCATGGCTGAACACAATC	Klonierung der <i>Bacillus subtilis</i> Lipase in den Hefe-Display-Vektor pCT
BS Hefe low	ATAAGCTTTTGTTCGGATCCATTCGTATTCTGGCCCCC	Klonierung der <i>Bacillus subtilis</i> Lipase in den Hefe-Display-Vektor pCT
Pa Hefe up	GGTGGTGGTGGTTCTGCTAGCACCTACACCCAGACCA AATAC	Klonierung der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lipase in den Hefe-Display-Vektor pCT
Pa Hefe low	ATAAGCTTTTGTTCGGATCCCAGGCTGGCGTTCTTCA	Klonierung der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Lipase in den Hefe-Display-Vektor pCT
CutBibA up	GCCCCGTGGTNNKACANNKACGGGCAACTTGGGANNK CTCGGTCCTAG	Cutinase CAST-Bibliothek A
CutBibA low	CTAGGACCGAGMNNTCCCAAGTTGCCCGTMNNTGT MNNACCACGGGC	Cutinase CAST-Bibliothek A
CutBibB up	GCGTTGGCGGTGCCTACCGAGCCACTNNKGAGACN NKGCTCTTCCTCGCGGAACC	Cutinase CAST-Bibliothek B
CutBibB low	AGTGGCTCGGTAGGCACCGCCAACGC	Cutinase CAST-Bibliothek B
CutBibC up	CGCCGGCGGCNNKAGCNNKGGTGCTGCACTTGC	Cutinase CAST-Bibliothek C
CutBibC low	GCAAGTGCAGCACCMNNGCTMNNGCCGCCGGCG	Cutinase CAST-Bibliothek C
CutBibD up	CTGTTCTGTTCGGCTACNNKAAGAACCTGCAGAAC	Cutinase CAST-Bibliothek D
CutBibD low	GTTCTGCAGGTTCTTMNNGTAGCCGAACAGAACAG	Cutinase CAST-Bibliothek D
CutBibE up	CAGGGGATCTCNNKTGTACCGGTAGCNNKATCNNKG CTGCACCTCAC	Cutinase CAST-Bibliothek E
CutBibE low	GTGAGGTGCAGCMNNGATMNNGCTACCGGTACAMN NGAGATCCCCCTG	Cutinase CAST-Bibliothek E

## 2.2 Molekulare Marker für Gelelektrophoresen

Lambda DNA/Eco47I (AvaII) Marker, 13 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

## 2.3 Enzyme und Proteine

Abcam, Cambridge, UK

Anti-c-Myc (monoklonaler Antikörper aus der Maus)

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Anti-E-Epitop Antikörper (1 mg/ml]

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

DNA-Längenstandards, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Taq-DNA-Polymerase

Invitrogen Corporation, Carlsbad

Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (1 mg/ml),

Anti-Dinitrophenyl IgG, Alexa-fluor488Konjugat (polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen)

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Meerrettich-Peroxidase (Typ VI-A)

Anti-Maus IgG (whole molecule), Biotin-Konjugat (polyklonaler Antikörper aus der Ziege),

Anti-Kaninchen IgG (whole molecule), Biotin-Konjugat (polyklonaler Antikörper aus der Ziege)

Sonstiges

anti-LipH Antikörper (polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen die Foldase LipH aus *P. aeruginosa*)

anti- LipA Antikörper (polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen die Lipase LipA aus *P. aeruginosa*)

Die Antikörper gegen LipA und LipH wurden freundlicherweise von Dr. Susanne Wilhelm und Dr. Frank Rosenau (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

## 2.4 Chemikalien

Acros Organics, Geel, Belgien

D-Galaktose

Applichem, Darmstadt

Imidazol, Isopropyl- $\beta$ D-thiogalactopyranosid (IPTG), Wasserstoffperoxidlösung 30 %, Chloroform

Becton, Dickinson and Company

Bacto™ Casamino Acids, Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o

Biochrom AG Berlin

Penicillin-Streptomycin

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Agar-Agar (Kobe I, pulv.), Roti®garose (NEEO Ultra-Qualität), Ethanol, Natriumchlorid, Salzsäure, Trypton/Pepton aus Casein (pankreatisch verdaut), Hefe-Extrakt, Bacillol plus, Glycerin, Tris-Base, Harnstoff, Isopropanol

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien, die zur Anwendung kamen.

Fluka, Buchs, Schweiz

Dimethylsulfoxid (DMSO), *p*-Nitrophenol, Bromphenolblau, Natriumchlorid, Saccharose

MBI Fermentas, Vilnius, Litauen

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Merck Chemicals KGaA, Darmstadt

Kaliumchlorid, Natriumborat

Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Borsäure, Ethidiumbromid, Chloramphenicol, Dimethylformamid (DMF, biotech grade solvent, 99,9 + %), Tributyrin, Tyramin, Gummi Arabicum, Natrium(meta)periodat

Sigma-Genosys, Steinheim

Oligodesoxirubonukleotide

## 2.5 Sonstige Materialien und Geräte

American National Can., Chicago, USA

Parafilm<sup>®</sup> "M" Laboratory Film

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Sephadex G-25 Gelfiltrationssäulen (PD-10)

HiTrap IMAC HP

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

EPICS Alignment Fluorespheres for optical alignment of flow cytometers (fluoreszierende MicroBeads), MoFlo<sup>®</sup> Cytometer mit Cyclone Sortiereinheit, Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) mit Coherent Enterprise II Laser, Summit<sup>®</sup> v4.0 Software-Paket (früher Dako Cytomation), Beckman Optima<sup>™</sup> LE-80K Ultrazentrifuge, SW41TI-Schwenkbecherrotor

Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Vortex<sup>®</sup> Genie 2

BioRad, München

Gene Pulser<sup>®</sup> und Pulse Controller, Elektroporationsküvetten (2 mm), Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell System

Brand, Wertheim

PLASTIBRAND<sup>®</sup> UV-Küvetten (halbmikro)

C. A. Greiner & Söhne, Nürtingen

Röhrchen 12 ml

CEAG Schirp Reinraumtechnik, Essen

Envirco Sterilbank

DeLano Scientific LLC., Palo Alto, USA

PyMol<sup>™</sup> v0.99rc6

Eppendorf, Hamburg

200 µl Mehrkanalpipette, Mastercycler<sup>®</sup> personal

Gilson, Middleton, USA

Mikroliter-Pipetten, 1000  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 10  $\mu$ l und 2  $\mu$ l

Glasbläserei der Technischen Universität Darmstadt, Darmstadt

Zwei-Kammer-Gradientenmischer für Sucrosegradienten

Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Ultraschallgerät Branson Sonifier W-250

Heinzinger, Rosenheim

Stromversorger LNGs 350-06

Helma, Müllheim/Baden

Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke)

Herolab, Wiesloch

UVT2035 302 nm UV-Leuchttisch, Plastikröhrchen für die Ultrazentrifugation

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Kühlzentrifuge Mikro Rapid/K, Kühlzentrifuge Rotanta/RPC, Kühlzentrifuge Roto  
Silenta/RP, Kühlzentrifuge Rotixa/RP, Mikroliter-Tischzentrifuge

Ibis Biosciences, Carlsbad, USA

BioEdit v7.0.7.0 *biological sequence alignment editor*

Ingold, Steinbach/Ts

pH-Elektrode U402-M5

Intas Gottingen

Geldokumentationssystem, Gel Jet Imager

IKA-Labortechnik, Staufen

beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT

JAI, Japan

CCD (*charge-coupled device*) Kamera CV-M4+CL

Kimberley-Clark, USA

Kimwipes<sup>®</sup> Papiertücher, fusselfrei

Menzel-Gläser, Braunschweig

Objektträger (76 x 26 mm), Deckgläser (18 x 18 mm)

Millipore, Eschborn

Filtereinheiten Millex FG13, Ultrafree-20 Nanopore-Wasser-Anlage

Promega, Madison, USA

PureYield Plasmid Miniprep System

PureYield Plasmid Midiprep System

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe

Rotiprotect<sup>®</sup>-Latexhandschuhe, puderfrei

Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2,0 ml, Röhrchen 50 ml, Röhrchen 15 ml PCR-Gefäße (Multiply<sup>®</sup>-μStrip, 8er-Kette), Petrischalen (92 x 16 mm und 150 x 20 mm)

Sartorius, Göttingen

Minisart NML Sterilfilter, Sartorius Universal U 4800P Feinwaage

Schott, Mainz

Glaswaren

Shimadzu, Weiterstadt

Zweistrahl-Spektralphotometer UV-1650-PC, UVProbe v2.20 Software-Paket

Systec, Wettenberg

Autoklav V-150

Tecan Trading AG, Mannedorf, Schweiz

ELISA-Reader GENios<sup>™</sup>

Terumo, Leuven, Belgien

Syringe Spritzen, 5 ml, 10 ml, 30 ml

The Scripps Research Institute, San Diego, USA

WinMDI 2.9

Zeiss, Göttingen

Mikroskop Axioskop mit Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz (Filtersätze: 487902 und 487909) und Kameraaufsatz, Okulare: Vergrößerung 10 x, Sehfeldzahl 20, Objektive: Plan Neofluar 63 x/1,25 Oil, 440480, Plan Neofluar 100 x/1,25 Oil, 440460, Acroplan 20 x, 440845, Immersionsöl

Mikroskop Axiovert 200M

Ziegra, Stockport, England

Eismaschine

## **2.6 Nährmedien zur Anzucht**

### **2.6.1 Nährmedien zur Anzucht von *E. coli***

dYT-Medium

1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1,6 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) NaCl

LB-Medium

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) 10 mM NaCl

SOB-Medium

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 10 mM NaCl

SOC-Medium

- Grundmedium:

0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Trypton, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl

- Supplementlösungen:

1 M Glukose-Lösung; 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung; 1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung

Die Supplementlösungen wurden getrennt vom Grundmedium autoklaviert und nach Erkalten des Mediums zugegeben (Endkonzentrationen: 20 mM Glukose; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>).

M9 Medium

- Grundmedium:

0,7 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 0,3 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1 % (w/v) NH<sub>4</sub>Cl H<sub>2</sub>O

- Supplementlösungen:

1 M Glukose-Lösung; 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung; 1 M MgSO<sub>4</sub>-Stammlösung; 100 mM FeCl<sub>2</sub>-Lösung; 0,1 % [w/v] Thiamin-Stammlösung



Die Supplementlösungen wurden getrennt autoklaviert bzw. sterilfiltriert und nach Erkalten des Mediums zugegeben (Endkonzentrationen: 25 mM Glukose, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,5  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_2$  und 0,0001 % Thiamin)

Alle verwendeten Nährmedien bzw. Grundmedien wurden zur Sterilisation 20 min bei 120 °C autoklaviert.

Für feste Medien wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Für M9-Festmedien wurde der Agar-Agar getrennt vom Medium in Wasser angesetzt und nach Autoklavieren zugegeben.

Antibiotika wurden aus den entsprechenden 1000fach konzentrierten Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 25 mg/l Chloramphenicol, 100 mg/l Ampicillin, 10 mg/l Tetrazykline bzw. 75 mg/l Kanamycin zugegeben.

## 2.6.2 Nährmedien zur Anzucht von *S. cerevisiae*

### YPD-Medium

2% (w/v) Glukose, 2% (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut, 1% (w/v) Hefe-Extrakt

### SDCAA-Medium

- Grundmedium:

0,54 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 0,856 % (w/v)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

- Supplementlösung:

20 % Glukose-Lösung; 6,7 % (w/v) Difco™ Yeast Nitrogen Base, 5 % (w/v) Bacto™ Casamino Acids Lösung

Die Supplementlösungen wurden getrennt autoklaviert bzw. sterilfiltriert und nach Erkalten des Mediums zugegeben (Endkonzentrationen: 2 % Glukose, 0,67% (w/v) Difco™ Yeast Nitrogen Base, 0,5% (w/v) Bacto™ Casamino Acids).

### SGCAA-Medium

- Grundmedium:

0,54 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 0,856 % (w/v)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

- Supplementlösung:

20 % Galaktose-Lösung; 6,7 % (w/v) Difco™ Yeast Nitrogen Base, 5 % (w/v) Bacto™ Casamino Acids Lösung

Die Supplementlösungen wurden getrennt autoklaviert bzw. sterilfiltriert und nach Erkalten des Mediums zugegeben (Endkonzentrationen: 2 % Galaktose, 0,67% (w/v) Difco™ Yeast Nitrogen Base, 0,5% (w/v) Bacto™ Casamino Acids).

Für feste Medien wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben. Für SDCAA- und SGCAA-Festmedien wurde der Agar-Agar getrennt vom Medium in Wasser angesetzt und nach Autoklavieren zugegeben. Im Weiteren wurde den beiden Medien 1 M Sorbitol zugegeben

## **2.7            Lösungen und Puffer**

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit demineralisiertem Wasser (Millipore, Nanopore-Wasser-Anlage) angesetzt.

### Antibiotika-Stammlösungen (sterilfiltriert):

- Ampicillin-Stammlösung:            100 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser
- Chloramphenicol-Stammlösung:   25 mg/ml Chloramphenicol in 96 % (v/v) Ethanol
- Kanamycin-Stammlösung:           75 mg/ml Kanamycin-Sulfat in Wasser
- Tetrazykline-Stammlösung:        10 mg/ml Tetrazykline-Hydrochlorid in Wasser

### Blocking-Lösung A (2-fach zur Selektion von Phagenbibliotheken)

4 % BSA in PBS

### Blocking-Lösung B (2-fach zur Selektion von Phagenbibliotheken)

4 % Milchpulver in PBS (dialysiert gegen PBS 1:200, um Biotin zu entfernen)

### Boratpuffer:

0,1 M Natriumborat (hergestellt aus Borsäure und NaOH), pH 9,1

### DTT-Lösung:

1 M Tris/HCl; 2,5 M DTT

### E-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH7,5; 270 mM Saccharose; 2mM MgCl<sub>2</sub>

### IB-Waschpuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,5 % (v/v) Triton X-100

**Imidazol-Puffer:**

1 M Imidazol/HCl, pH 8

**IPTG-Stammlösung:**

1 M IPTG in Wasser (sterilfiltriert)

**PBS-Puffer:**

40 mM NaCl; 10 mM KCl; 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**Puffer S:**

1 M Sorbitol; 10 mM PIPES, pH 6,5

**Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas):**

Blau: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>

Gelb: 33 mM Tris-Acetat, pH 7,9; 10 mM Magnesiumacetat; 66 mM Kaliumacetat

Grün: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl

Orange: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl

Rot: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl

**Sucrosefarbmarker:**

60 % (w/v) Sucrose; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 % (w/v) Xylencyanol FF in 1 x TBE

**Sucrosegradientenpuffer:**

100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl

**T4-DNA-Ligase-Puffer:**

400 mM Tris/HCl, pH 7,8; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM DTT; 5 mM ATP

**TBS:**

100 mM Tris/HCl, pH 7,4; 0,1 mM NaCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>

**TBS-T:**

100 mM Tris/HCl, pH 7,4; 0,1 mM NaCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,05 % Tween 20

**TBE-Puffer:**

89 mM Tris/HCl; 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA

**TE-Puffer:**

10 mM Tris/HCl ; 0,5 mM EDTA, pH 8,0

Tyramid-Reaktionspuffer:

90 % (v/v) PBS, pH 7,4; 10 % (v/v) 1 M Imidazol-Puffer, pH 7,8; 0,001 % (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$

Taq-Puffer:

100mM Tris/HCl, pH 9,0; 500 mM Kaliumchlorid; 15 mM Magnesiumchlorid;  
1 % (v/v) Triton-X-100

## **3 Methoden**

### **3.1 Handhabung von Mikroorganismen**

#### **3.1.1 Lagerung und Vermehrung von Mikroorganismen**

##### **3.1.1.1 Lagerung von *E. coli* Stämmen**

Die verwendeten Bakterienstämme von *Escherichia coli* wurden zur längerfristigen Aufbewahrung nach Zugabe von 7 % DMSO (v/v) als Gefrierkulturen bei -80 °C gelagert. Häufig verwendete Bakterienstämme wurden auf M9-Minimalagarplatten oder Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37 °C angezogen. Die angezogenen Platten wurden bei 4 °C für einige Wochen aufbewahrt.

##### **3.1.1.2 Anzucht von *E. coli* Stämmen**

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden bei 37 °C angezogen. Für Flüssigkulturen wurde dYT-Medium verwendet. Diese wurden bei einem Volumen bis 2 ml Kultur in 96 Deepwell Platten, bei einem Volumen bis 5 ml in Kulturröhrchen und bei größeren Volumina im entsprechenden Schüttelkolben auf dem Inkubationsschüttler, bei 150-190 Upm kultiviert. Bei vorhandenen Resistenzen wurde das verwendete Medium mit dem entsprechenden Antibiotika komplettiert. Als Übernacht-Kulturen werden Kulturen bezeichnet, welche mindestens 16 Stunden bebrütet wurden. Für die Anzucht auf Festmedien wurden für Stämme ohne Resistenz M9-Festmedien und für Stämme mit Resistenz LB-Festmedien mit entsprechenden Antibiotika verwendet.

##### **3.1.1.3 Lagerung von *S. cerevisiae* EBY100**

Der verwendete Hefestamm *S. cerevisiae* EBY100 wurde zur längerfristigen Aufbewahrung nach Zugabe von 7 % DMSO (v/v) als Gefrierkultur bei -80 °C gelagert. Für die ständige Verwendung wurde der Hefestamm auf YPD-Agarplatten oder SDCAA-Selektionsplatten ausgestrichen und bei 30 °C angezogen. Die angezogenen Platten wurden bei 4 °C für einige Wochen aufbewahrt.

#### **3.1.1.4 Anzucht von *S. cerevisiae* EBY100**

Die Anzucht von EBY100 in Flüssigkultur erfolgte bei 30 °C in YPD- oder SDCAA-Medium. Die Kulturen wurden bei einem Volumen bis 5 ml in Kulturröhrchen und bei größeren Volumina im entsprechenden Schüttelkolben auf dem Inkubationsschüttler bei 150-190 Upm kultiviert. Bei vorhandenen Resistenz wurde das verwendete Medium mit den entsprechenden Antibiotika komplettiert. Für die Anzucht auf Festmedien wurden YPD-Agarplatten oder SDCAA-Selektionsplatten verwendet.

#### **3.1.2 Bestimmung der Zelldichte**

Die Zelldichte der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) im Spektralphotometer bestimmt. Als Leerwert wurde unbeimpftes Medium verwendet. Die Kulturen wurden gegebenenfalls verdünnt und die tatsächliche Dichte errechnet.

#### **3.1.3 Transformation durch Elektroporation**

##### **3.1.3.1 Erstellung von kompetenten Zellen und Transformation von *E. coli***

Die Transformation von *E. coli* erfolgte über Elektroporation (Dower *et al.* 1988). Hierzu wurde für die Herstellung von kompetenten Zellen der entsprechende *E. coli*-Stamm in 50 ml SOC-Medium bis zu einer  $OD_{600}$  von ca. 0,5 herangezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Hettich-Kühlzentrifuge, 4.000 Upm, 12 min, 4 °C) geerntet, in 30 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimalig wiederholt, wobei beim zweiten Mal in 20 ml, beim dritten Mal in 10 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert wurde. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in dem restlichen Wasser resuspendiert. Während der gesamten Prozedur wurden die Zellen auf Eis gehalten. Zur Transformation wurden 50-100 µl Zellsuspension mit einer zur gewünschten Transformandenanzahl führenden DNA-Menge versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Die Elektroporation wurde im Gene Pulser® (BioRad) bei folgenden Einstellungen durchgeführt: 200 mA Stromstärke, 2,5 V Spannung, 6.250 V/cm Feldstärke, 5 s Impuls, 4,0-4,5 ms Zeitkonstante und Raumtemperatur. Unmittelbar nach dem

Potentialpuls wurde 1 ml steriles SOB-Medium in die Elektroporationsküvette pipettiert und der Inhalt in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf LB-Selektivagarplatten ausgestrichen bzw. 50 µl selektives dYT-Medium mit der Kultur beimpft.

Zur Transformation von *E. coli* mit CAST-Enzymbibliotheken wurden je Bibliothek fünf identische Ligationsansätze verwendet. Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurden zwei Ansätze mit je 400 µl SOB-Medium verwendet. Diese wurden wie im vorangegangenen Absatz beschrieben behandelt. Zwischen den einzelnen Waschschritten ruhten die Zellen für 30 Minuten auf Eis. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen wieder vereinigt und für die Elektroporation verwendet. Die Elektroporationsküvetten wurden noch ein zweites Mal mit je 1 ml sterilem SOC-Medium gespült. Die transformierten Zellen wurden in einem Kulturröhrchen gesammelt. Die Vermehrung der transformierten Zellen erfolgte auf großen (150 x 20 mm) dYT-Selektivagarplatten. Zur Bestimmung der Transformandenanzahl wurden zusätzlich Verdünnungsplattierungen angefertigt.

### **3.1.3.2 Erstellung von kompetenten Zellen und Transformation von *S. cerevisiae* EBY100**

Die Transformation von *S. cerevisiae* EBY100 erfolgte über Elektroporation (Chao *et al.* 2006). Für die Herstellung von kompetenten Zellen wurde eine Übernachtskultur bei 30 °C angezogen. Mit einem Inokulum dieser Kultur wurden eine oder mehrere 50 ml Kulturen auf eine OD<sub>600nm</sub> von 1 angeimpft. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von 1,3-1,5 wurde der Kultur 500 µl sterilfiltrierte DTT-Lösung (2,5 M DTT in 1 M Tris/HCl, pH 8) für 15 min zugesetzt. Die vorbehandelten Zellen wurden durch Zentrifugation (Hettich-Kühlzentrifuge, 2.000 Upm, 3 min, 4 °C) geerntet und mit 25 ml eiskaltem E-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 270 mM Saccharose; 2 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. Nach einem zweiten Waschschritt mit 1 ml Puffer E wurden die Zellen in Puffer E aufgenommen und auf ein Volumen von 300 µl gebracht. Die Zellen wurden während der kompletten Prozedur auf Eis gehalten.

Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden mit einer entsprechenden DNA Menge versetzt und in vorgekühlte Küvetten (2 mm) gefüllt. Die Elektroporation wurde im

Gene Pulser<sup>®</sup> (BioRad) bei folgenden Einstellungen durchgeführt: 0,45 kV Spannung und 25  $\mu$ F.

Unmittelbar nach dem Puls wurde die Elektroporationsküvette zwei Mal mit je einem Mililiter sterilem YPD-Medium (vorgewärmt auf 30 °C) gespült. Das YPD-Medium mit den transformierten Zellen wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellsuspension wurde für eine Stunde bei 30 °C unter schütteln inkubiert. Die Zellen wurden pelettiert und in 10 ml SDCAA-Medium aufgenommen. Für die Bestimmung der Transformationseffizienz wurden Verdünnungen auf SDCAA-Platten ausplattiert. Das restliche Transformationsgemisch wurde in einen Schüttelkolben gegeben (100-1000 ml). Des Weiteren wurde dem Medium zur Selektion Penicillin und Streptomycin zugesetzt.

## **3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

Molekularbiologische Arbeitstechniken, die im Folgenden nicht explizit aufgeführt sind, wurden nach Sambrook *et al.* durchgeführt (Sambrook und Russell 2001).

### **3.2.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen**

Hitzestabile Geräte wurden durch Erhitzen für 20 min auf 181 °C sterilisiert. Hitzestabile Lösungen wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. In der Hitze nicht beständige Geräte wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gereinigt und getrocknet. Hitzelabile Bestandteile von Lösungen wurden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt und vor der Zugabe zu bereits sterilen Lösungen durch einen Membranfilter der Porengröße von 0,2  $\mu$ m sterilfiltriert.

### **3.2.2 Methoden zur Präparation und Analyse von DNA**

#### **3.2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte über das PureYield<sup>™</sup> Plasmid Miniprep System oder das PureYield<sup>™</sup> Plasmid Midiprep System von Promega GmbH nach Angaben des Herstellers.



### **3.2.2.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* wurden je Präparation >10 ml Kultur abzentrifugiert und in 200 µl Puffer S aufgenommen. Für das Aufschließen der Zellen wurden diese zunächst für 1-2 Stunden mit 0,2 U Zymolase (*Yeast lytic enzym*, MP Biomedicals, LLC) in Puffer S vorbehandelt, um die Zellwand zu zerstören. Die vorbehandelten Zellen wurden abzentrifugiert. Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde das PureYield™ Plasmid Miniprep System von Promega GmbH nach Angaben des Herstellers verwendet.

### **3.2.2.3 Reinigung von DNA in wässriger Lösung durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln**

Für die Reinigung von DNA in wässrigen Lösungen wurden Proteine und andere hydrophobe Kontaminationen mit Phenol und Chloroform aus der Probe extrahiert. Hierzu wurde die Lösung zuerst mit 1 Vol. Phenol versetzt. Zur Separation der Phasen wurde der Ansatz zentrifugiert (13.000 Upm, 2 min, Raumtemperatur). Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1 Vol. Phenol/Chloroform versetzt. Nach erneutem Separieren der Phasen mittels Zentrifugation wurde die Extraktion mit Chlorophorm wiederholt, um das restliche Phenol aus der Probe zu entfernen.

### **3.2.2.4 Alkoholische Präzipitation von DNA**

Zur Präzipitation von DNA wurde die DNA-haltige Lösung mit 1/10 Vol. 7 M Ammoniumacetat sowie drei Vol. 96 % Ethanol versetzt und für die Präzipitierung für 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Zur vollständigen Präzipitation wurde für 30 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 4 °C und 13.000 Upm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 700 µl Ethanol gespült und im Anschluss getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in der gewünschten Konzentration in Wasser aufgenommen.

### **3.2.2.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA**

Die Konzentration von DNA in Lösung wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie durch Messung der Absorption bei 260 nm mit einem Spektralphotometer bestimmt. Eine Absorption OD<sub>260nm</sub> von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Um die Verunreinigungen durch Proteine zu kontrollieren, wurde das

Verhältnis  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  bestimmt. Eine reine DNA-Lösung sollte eine  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  –Verhältnis von  $>1,6$  aufweisen (Sambrook und Russell 2001). Zudem erfolgte eine Konzentrationsabschätzung über die gelelektrophoretische Auftrennung über den Standard mit bekannter Konzentration.

#### **3.2.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten zu Analyse und Reinigung**

Zur Analyse und gezielten Isolierung von DNA-Fragmenten wurde Agarose-Gelelektrese verwendet (Sambrook und Russell 2001). Für die Auftrennung der DNA-Fragmente und Plasmide wurden mit Ethidiumbromid versetzte 1-2 % Agarosegele verwendet. Als Elektrophoresepuffer wurde TBE-Laufpuffer verwendet. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Sucrosecfarbmarker versetzt. Als Größenstandart wurde der Lambda DNA/ Eco47I (*AvaII*) Marker, 13 von Fermentas GmbH verwendet. Die Detektion erfolgte durch die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids bei UV-Durchlicht (302 nm). Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert (Gel Jet Imager, INTAS/Göttingen).

#### **3.2.2.7 Separation von DNA-Fragmenten mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation**

Die DNA-Fragmente (Vektorfragmente), welche in größeren Mengen benötigt wurden (z.B. für Bibliotheken), wurden mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation gereinigt. Die Fragmente aus dieser Reinigung zeigen eine höhere Effizienz einer nach Ligation erfolgenden Transformation im Vergleich zu Fragmenten, die aus einem Agarosegel gereinigt wurden.

In das Ultrazentrifugenröhrchen wurden 400  $\mu$ l 40 % Saccharose (in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl) vorgelegt und mit einem Gradient von 30-10 % Saccharose (in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl) überschichtet. Auf den fertigen Gradienten wurden ca. 100  $\mu$ g verdaute DNA in einem Volumen von höchstens 200  $\mu$ l Volumen aufgetragen und anschließend mit Paraffin überschichtet. Die Separation erfolgte für 21 Stunden bei 30.000 Upm und 4 °C im SW41TI-Schwenkbecherrotor in einer Beckman Optima™ LE-80K Ultrazentrifuge. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient in 500  $\mu$ l Fraktionen aliquotiert. Die Analyse der Fraktionierung erfolgte über Gelelektrophorese. Die Fraktionen, welche

das gewünschte Fragment enthielten, wurden gepoolt und durch Fällung mit Ethanol aufkonzentriert (3.2.2.4). Vor der weiteren Verwendung wurde von der in Wasser gelösten Probe die Konzentration (3.2.2.5) bestimmt.

### **3.2.3 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen für die Spaltung von DNA wurden von Fermentas GmbH bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet.

### **3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA Ligase von Fermentas GmbH nach Herstellerangaben verwendet. Der Ligationsansatz wurde vor einer Transformation von *E. coli* Zellen mit Ethanol präzipitiert (3.2.2.4) und in 20  $\mu$ l sterilen, demineralisierten Wassern aufgenommen.

### **3.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde nach Sambrook *et al.* durchgeführt. Standardmäßig wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 50  $\mu$ l angesetzt. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

1 ng Plasmid-DNA als Matrizen-DNA, 25 pmol von jedem Oligonukleotid, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U *Taq*-Polymerase (Fermentas GmbH). Als Puffer wurden der Puffer des Herstellers verwendet und mit einer entsprechenden  $MgCl_2$ -Konzentration versetzt. Für die Amplifikation der Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* wurden dem Ansatz noch 2  $\mu$ l DMSO zugesetzt.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem PCR-Automaten („Mastercycler“) der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Dabei kamen folgende Programme zur Anwendung:

30 Zyklen:	Aufschmelzen der DNA	2 min	98 °C
	Aufschmelzen	1 min	98 °C
	<i>Annealing</i>	30 sec	45 °C - 60 °C
	<i>Elongation</i>	1 min/kbp	72 °C
	Endelongation	2 min	72 °C
	Kühlen	hold	4 °C

Die optimale Annealing-Temperatur  $T_A$  für eine Polymerasekettenreaktion wurde wie folgt bestimmt:

$$T_A = \frac{(T_{M1} + T_{M2})}{2} - 3\text{ °C}$$

$T_{M1}$  und  $T_{M2}$  stehen dabei für die Schmelztemperaturen der Beiden für die jeweilige PCR verwendeten Primer.

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte über Chloroform/Phenolextraktion mit anschließender Ethanol-Fällung.

### **3.2.5.1 SOE-PCR (splicing by overlap extension)**

Zielgerichtete Basenaustausche für die CAST-Bibliotheken der Cutinase wurden über eine zweistufige SOE-PCR (splicing by overlap extension) eingeführt (Ho *et al.* 1989). Hierzu wurden zunächst zwei sich überlappende PCR-Fragmente des Ausgangsgens amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so definiert, dass sie sich zum einen überlappen (ca. 25 bp) und zum anderen die Mutation einfügen. Nach Möglichkeit wurde in die Primer eine Restriktionsschnittstelle inseriert oder deletiert, um eine Detektionsmöglichkeit zwischen wildtyp Gen und Mutante zu haben. Nach Reinigung der Fragmente über Agarosegelelektrophorese (3.2.2.6) wurden diese als Matrize in einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt. Das so entstandene Produkt wurde über eine

weitere Standard-PCR hochamplifiziert. Das entstehende Endprodukt wurde schließlich mittels Phenol/Chloroform Extraktion (3.2.2.3) und anschließender Ethanol Präzipitation (3.2.2.4) für nachfolgende Anwendungen gereinigt.

### **3.2.5.2 Kolonie PCR**

Zur Analyse von Einzelklonen oder Klon-Pools nach Klonierungen wurde eine sogenannte Kolonie-PCR durchgeführt. Für die Analyse von *E. coli* wurde ein PCR-Ansatz, wie unter 3.2.5 beschrieben ohne Taq-Polymerase verwendet. In den PCR-Ansatz wurden Zellen der gewünschten Probe gegeben. Zum Aufschluss der Zellen wurde ein verlängerter Denaturierungsschritt von 5 min bei 98 °C durchgeführt. Nach diesem wurde die Taq-Polymerase zugegeben. Die PCR wurde wie unter 3.2.5 durchgeführt.

Bei der Analyse von Hefe-Einzelklonen musste zunächst die Lyse der Zellwände erfolgen. Hierzu wurden die Zellen zunächst in 20 µl S-Puffer gegeben und mit 2 µl *Yeast Lytic* Enzym bei 30 °C inkubiert. Danach wurden 10 µl des Reaktionsansatzes in einen Standard-PCR-Ansatz gegeben und die PCR wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt.

### **3.2.6 Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen wurden von SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt.

## **3.3 Proteinchemische Arbeitsmethoden**

### **3.3.1 Isolierung von rekombinant hergestellten Proteinen und Proteinreinigung**

#### **3.3.1.1 Herstellung von Zellextrakten**

Für die Isolierung und Reinigung der rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteine wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (Hettich-Kühlzentrifuge, 4.000 Upm, 10 min, 4 °C). Das Zellsediment wurde je nach weiterem Verwendungszweck entsprechend in Puffer aufgenommen und anschließend einer Ultraschallbehandlung unterzogen (Branson-Sonifier W250, 3 × 3 min, Leistungszyklus 50 %, auf Eis). Die erhaltenen Proben wurden sofort verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -

20 °C gelagert. Für die chromatographischen Reinigungen löslicher Proteine wurden die Zellextrakte abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 15.000 Upm Sigma-Kühlzentrifuge) und restliche Partikel durch steriltr filtrieren (0,45 µm, Schleicher & Schüll) abgetrennt.

### **3.3.1.2 Isolierung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*)**

Kulturen, die nach Überexpression Einschlusskörper (*inclusion bodies*) enthielten, wurden sedimentiert (Hettich-Kühlzentrifuge, 4.000 Upm, 10 min, 4 °C) und in 20-25 ml IB-Waschpuffer resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese auf Eis mit Ultraschall behandelt (drei Durchgänge für 3 min bei 75 W). Die festen Bestandteile einschließlich der Einschlusskörper wurden für 15 min bei 15.000 Upm (Sigma-Kühlzentrifuge) abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in IB-Waschpuffer aufgenommen und wie zuvor sonifiziert. Im nächsten Schritt wurde das Pellet in Wasser aufgenommen und ebenfalls sonifiziert und erneut pelletiert. Die Waschschr itte wurden je nach Verunreinigungsgrad, welcher optisch sichtbar war, angepasst. Die isolierten Einschlusskörper wurden in 8 M Harnstoff aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

### **3.3.1.3 Isolierung von Membranproteinen**

Zur Isolierung von Membranproteinen wurden die induzierten Zellen zunächst sedimentiert (Hettich-Kühlzentrifuge, 4.000 Upm, 10 min, 4 °C) und in Puffer (10 ml Tris/HCl, pH 8) aufgenommen. Die Zellen wurden durch sechsmaliges Sonifizieren für 1 Minute auf Eis aufgeschlossen (75 W). Grobe Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 15.000 Upm (Sigma-Kühlzentrifuge) abgetrennt. Der Überstand wurde mit EGTA und Triton X-100 versetzt (Endkonzentration: 10 mM EGTA; 1 % Triton X-100). Nach einer halben Stunde Inkubation auf Eis wurde das Gemisch für zwei Stunden bei 30.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt die präparierten Membranproteine. Diese wurden für elektrophoretische Untersuchungen in Wasser mit SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Für Enzymtests wurde der entsprechende Puffer zur Resuspension verwendet.

### **3.3.1.4 Säulenchromatographische Methoden**

#### **3.3.1.4.1 Affinitätschromatographie über Ni<sup>2+</sup> Chelating Sepharose**

Für die Reinigung der meisten rekombinant hergestellten Proteine wurden diese als Fusionsproteine mit Poly-Histidin exprimiert. Die Reinigung erfolgte durch immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). Hierfür wurde eine Chromatographie-Säule (HiTrap IMAC HP, GE Healthcare) verwendet. Diese wurde an ein ÄKTA-System (P-900, GE Healthcare) angeschlossen. Die Flussgeschwindigkeit wurde bei 1 ml/min eingestellt, so dass der Druck 3 bar nicht überschritt.

Die Säule wurde nach Herstellerangaben mit Nickel beladen und mit mindestens 5 Säulenvolumen Grundpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 250 mM KCl) equilibriert. Auf die equilibrierte Säule wurde das in Grundpuffer hergestellte, sterilfiltrierte Zellextrakt aufgetragen (3.3.1.1). Nach Auftrag wurde mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 250 mM KCl; 40 mM Imidazol) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. Im Anschluss wurde das Fusionsprotein durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration eluiert. Die Elution von Proteinen wurde über die Detektion der Absorption bei  $\lambda = 280 \text{ nm}$  verfolgt.

Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte nach abgeschlossener Elution nach Angaben des Herstellers. Die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE (3.3.2.1) kontrolliert. Fraktionen, welche das gewünschte Protein enthielten, wurden gepoolt und wenn nötig dialysiert, um in der Probe enthaltenes Imidazol zu entfernen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proteinlösungen bei 4 °C gelagert.

#### **3.3.1.4.2 Dialyse von Proteinen**

Die Dialyse von Proteinen ermöglicht es, ungewünschte Fremdstoffe (wie z.B. Imidazol) aus der Probe zu entfernen oder das Protein in einen anderen Puffer zu überführen. Das sich in Lösung befindende Protein wurde hierzu in einen Dialyseschlauch (12.000-14.000 MWCO; Carl Roth GmbH und Co.KG) überführt und in den gewünschten Puffer (ca. 1.000 Volumen der Probe) über Nacht bei 4 °C gegeben. Um eine komplette Umpufferung zu erhalten, wurde der Puffer getauscht und es erfolgte eine erneute Inkubation für mindestens 4 Stunden.

### 3.3.2 Elektrophoretische Methoden zur Auftrennung von Proteinen

#### 3.3.2.1 Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Analyse von Proteinproben wurden diese über diskontinuierliche SodiumDodecylSulfat-PolyAcrylamid-GelElektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer apparenten molekularen Masse aufgetrennt (Laemmli 1970). Hierzu wurde das Mini-PROTEAN® 3 Cell System der Firma Biorad, München verwendet. Für die Auftrennung wurde ein 5 % Sammelgel (pH 6,8) und ein 12,5 % Trenngel (pH 8,8) verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 7).

Die Gele wurden nach Vorschrift im Gießstand des Mini-PROTEAN® 3 Cell Systems hergestellt. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit Laufpuffer (250 mM Tris, pH 8,2-8,3; 1,92 M Glycin; 35 % SDS) gefüllt.

Die Proben wurden in gewünschter Konzentration in die entsprechende Menge 4 fach Auftragspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 20 % [v/v] Glycerin; 5 % [w/v] SDS; 200 mM DTT; 0,1 % [w/v] Bromphenolblau) aufgenommen und für fünf Minuten aufgekocht. Die behandelten Proben wurden in die Geltaschen aufgetragen. Zur Abschätzung der molekularen Masse der Proteine wurden jeweils 7 µl eines Proteinstandards (*Protein Molecular Weight- Marker*, Fermentas) aufgetragen.

Als Laufbedingungen wurden 80 V bis zum Einwandern der Proben in das Gel und 200 V bis Beenden der Elektrophorese gewählt.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Gelelektrophorese.**

Trenngel (12,5%)		Sammelgel (5%)	
Trenngelpuffer (1,875 M Tris-HCl, pH 8,8)	8 ml	Sammelgelpuffer (1,25 M Tris-HCl, pH 6,8)	5,2 ml
Rotiphorese® Gel 30 Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (Roth)	16,8 ml	Rotiphorese® Gel 30 Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (Roth)	2,8 ml
Bidest. Wasser	6,8 ml	Bidest. Wasser	8 ml
75 % [v/v] Glycerin	8 ml	75 % [v/v] Glycerin	4 ml
10 % [w/v] SDS	400 µl	10 % [w/v] SDS	200 µl
10 % [w/v] APS	200 µl	10 % [w/v] APS	160 µl
TEMED	40 µl	TEMED	40 µl



### 3.3.2.2 Anfärben der Proteine nach der Elektrophorese mittels Coomassie Brilliantblau

Die Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mittels dem anionischen Coomassie Serva Blau G-250 (modifiziert nach Zehr *et al.* 1989) angefärbt. Hierzu wurde das Gel für 1 Stunde oder länger in der Färbelösung (50 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Eisessig; 0,9 % [w/v] Serva Blau G-250) inkubiert und anschließend der überschüssige Farbstoff in Entfärbelösung (5 % [v/v] Ethanol; 7,5 % [v/v] Eisessig) entfernt. Die gefärbten Gele wurden zur Dokumentation auf einen Leuchttisch gelegt und fotografiert (Gel Jet Imager, INTAS/Göttingen).

### 3.3.3 Konzentrationbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentrationen wurden über fotometrische Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Reste der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Cysteine die über Disulfidbrücken verknüpft sind. Die Konzentration wurde unter Berücksichtigung der einzelnen molaren Extinktionskoeffizient und dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet (siehe folgende Formel Pace *et al.* 1995).

$$\epsilon_{280\text{nm}} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}] = (N_{\text{Trp}} \cdot 5500) + (N_{\text{Tyr}} \cdot 1490) + (N_{\text{Cys}} \cdot 125)$$

Dabei ist  $N_{\text{Trp}}$  die Anzahl der Aminosäure Tryptophan,  $N_{\text{Tyr}}$  die Anzahl der Aminosäure Tyrosin und  $N_{\text{Cys}}$  die Anzahl der Disulfidbrücken im entsprechenden Protein.

### 3.3.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die immunologische Detektion von Proteinen erfolgte zum einen mittels Western Blot-Analyse und zum anderen über Dot Blot-Analyse.

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen mittels Western Blot wurden die durch SDS-PAGE (3.3.2.1) aufgetrennten Proteine unter Verwendung der Apparatur „Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“ (Bio-Rad, München) auf eine Nitrozellulose-Membran (0,45  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll) übertragen (Swanson *et al.* 1982). Hierzu wurden das Gel, die Nitrozellulose-Membran sowie die für den Transfer verwendeten Filterpapiere (Whatmann) in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 20 %

(v/v) Methanol) äquiliibriert. Der Proteintransfer erfolgte für 45 Minuten bei 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Nitrozellulose-Membran und konstanter Stromstärke.

Der Transfer der Proteine wurde durch das Anfärben der Membran mit PoncauS-Färbung überprüft. Durch mehrfaches Waschen mit Wasser wurde der Farbstoff im Anschluss wieder von der Membran entfernt.

Die freien Bindestellen der Membran wurden durch Inkubieren der Membran in 5 % Milchpulver in TBS über Nacht abgesättigt. Die geblockte Membran wurde vor der Zugabe des Erstantikörpers drei Mal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde in 30 ml Antikörperlösung (Erstantikörper 1:40.000 in TBS mit 2,5 % Milchpulver) gegeben und für mindestens 1 Stunde bei RT geschüttelt. Nicht gebundene Antikörpermoleküle wurden durch fünfmaliges waschen für 5 Minuten mit TBS-T entfernt. Für die Detektion wurde die Membran mit dem mit alkalischer Phosphatase konjugiertem sekundären Antikörper (anti-Maus/Anti-Kaninchen-Antikörper 1:10.000 in TBS) für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde drei Mal mit TBS-T und im Anschluss zwei Mal 5 Minuten mit alkalischem Phosphatase-Puffer gewaschen. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte durch Inkubation mit einem chromogenen Substrat für alkalische Phosphatase (Leary *et al.* 1983). Hierzu wurden in 30 ml alkalische Phosphatase-Puffer 12,5 µl NBT-Stammlösung und 70 µl BCIP-Stammlösung gegeben und bis zur gewünschten Färbung mit der Membran inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurde diese drei Mal mit PBS gewaschen, da Phosphat die alkalische Phosphatase inhibiert. Die Dokumentation erfolgte durch Scannen der Membran.

Bei der Dot Blot-Analyse wurden die Proteinlösungen direkt auf die verwendete Membran aufgetragen (1-10 µl). Nachdem die Membran getrocknet war, wurde mit diese wie bei der Western Blot-Analyse verfahren.

### **3.3.5 Chemische Modifikation von Proteinen**

#### **3.3.5.1 Oxidation und Reinigung von Meerrettich-Peroxidase**

Für den Oberflächen-gekoppelten Enzymtest von lipolytischen Enzymen (ESCAPED-Verfahren 1.3.2.1) wurde Meerrettich-Peroxidase auf die Oberfläche von *E. coli*-Zellen und Hefezellen gekoppelt. Hierfür wurden die endständigen Zuckerreste der glycosylierten Meerrettich-Peroxidase mit Natrium(meta)periodat zu Aldehyden ohne

Verlust der Aktivität oxidiert. Zur Oxidation wurden 20  $\mu\text{l}$  Natriumperiodatlösung (0,088 M Natriumperiodat in dd. Wasser) zu 200  $\mu\text{l}$  Meerrettich-Peroxidase Sigma Typ VI-A (10 mg/ml, in  $\text{H}_2\text{O}$ , Sigma Aldrich Inc.) gegeben und eine Stunde unter langsamen Schütteln (Thermomixer comfort 1,5 ml; Eppendorf AG). Im Anschluss wurde das cytotoxische Periodat über eine Sephadex G-25 PD-10 Gelfiltrationssäule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) aus der Probe entfernt. Die Säule wurde nach Herstellerangaben mit 0,1 M Boratpuffer pH 9,1 äquilibriert. Die Elution konnte hierbei über die grün-braune Farbe der Peroxidase verfolgt werden. Die farbige Peroxidase-Fraktion wurde aufgefangen und mit Boratpuffer auf ein Endvolumen von 2 ml gebracht (Konzentration ca. 1 mg/ml). Bis zur Verwendung wurde das oxidierte Enzym in 100  $\mu\text{l}$  Aliquots dunkel bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.3.5.2 Biotinylieren von Proteinen

Für die Biotinylierung von Proteinen wurde das Zielmolekül mit einem 3-fachen molekularen Überschuss an EZ-link™ Sulfo NHS-LC Biotin (Fisher Scientific GmbH) versetzt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach Entfernen des überschüssigen Biotins über Sephadex G-25 PD-10 Gelfiltrationssäule (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) wurde die Anzahl der gekoppelten Biotinmoleküle pro Zielmolekül über HABA/Avidin-Test (2-[4'-Hydroxyazobenzol]-carboxylsäure/Avidin-Test) bestimmt. Hierzu wurde eine Stammlösung von Sigma Aldrich bezogen und nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration an Biotin in der Probe wurde wie folgt bestimmt.

$$\text{Biotin} \frac{\text{nmol}}{\text{ml}} = \frac{\left( (A_{500\text{ nm (Pufferkontrolle)}} - A_{500\text{ nm (Probe)}}) * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^6 \right)}{\varepsilon}$$

$$\varepsilon = 34000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Für das molare Biotin zu Protein-Verhältnis wurde die Proteinkonzentration in nmol/ml zur Biotinkonzentration (nmol/ml) ins Verhältnis gesetzt.

### **3.3.6 Enzymatische Aktivitätstest**

#### **3.3.6.1 Herstellen von Tributyrinplatten**

Für den Nachweis von lipolytischer Aktivität auf *E. coli* und *S. cerevisiae* EBY100 wurden Selektionsplatten mit Tributyrin verwendet. Hierzu wurde Festmedium mit einer Emulsion aus Tributyrin und Gummi arabicum in Wasser versetzt.

##### **3.3.6.1.1 Tributyrinplatten für *E. coli***

Zum Nachweis von lipolytischer Aktivität wurden Tributyrinagarplatten verwendet. Hierzu wurde LB-Agar mit Tributyrin-Emulsion versetzt (1,5 % v/v Tributyrin und 0,15 % w/v Gummi arabicum in sterilem destiliertem Wasser; Gesamtvolumen 30 ml/l Agar). Um eine vollständige Emulsion des Tributyrins in Wasser zu erhalten, wurde die Suspension für 3 Minuten mit Ultraschall (75 W) behandelt und dann in den autoklavierten LB-Agar (auf ca. 60 °C abgekühlt) gegeben. Zur Selektion wurde dem Agar Antibiotika zugegeben und zur Induktion der Expression relevanter Gene wurde der Agar zusätzlich mit 1 mM IPTG oder mit 12,5 mM Anhydrotetracyclin komplettiert (Brockerhoff 1969; Kok *et al.* 1993).

##### **3.3.6.1.2 Tributyrinplatten für *S. cerevisiae* EBY100**

Für die Präsentation von Lipasen auf Hefen wurde als Aktivitätsnachweis ebenfalls Tributyrinagarplatten verwendet. Hierzu wurden SGCAA-Platten mit Tributyrin-Emulsion versetzt (0,5 % v/v Tributyrin und 0,15 % w/v Gummi arabicum in sterilem dd. Wasser; Gesamtvolumen/l Agar). Die Herstellung der Tributyrinemulsion wurde wie für die bei *E. coli* verwendeten Tributyrinagarplatten hergestellt (Su *et al.* 2009).

#### **3.3.6.2 Bestimmung von lipolytischer Aktivität**

Für die Bestimmung von lipolytischer Aktivität wurden Carbonsäureester des *p*-Nitrophenols verwendet. Die verwendeten Ester sind in Tabelle 8 aufgelistet. Das bei der Hydrolyse entstehende *p*-Nitrophenol-Anion kann durch spektralphotometrische Messung der Absorption bei 405 nm registriert und aufgezeichnet werden. Für die Aktivitätsmessung wurde das Substrat in Ethanol oder Isopropanol gelöst und in den Reaktionspuffer gegeben. Der Substratlösung von *p*-Nitrophenylpalmitat wurden für eine bessere Emulsion Natriumdeoxychelat (2 % w/v) und Gummi arabicum (1 %

w/v)zugegeben. Für die Messung wurden 150  $\mu\text{l}$  der Emulsion pro 1 ml Reaktionsansatz verwendet (Endkonzentration 0,18  $\mu\text{mol}$ ).

**Tabelle 8: Verwendete Nitrophenyl-Substrate mit zugehörigen Lösemitteln.**

Substrat	Lösemittel
p-Nitrophenylbutyrat	Ethanol
p-Nitrophenylcaprylat	Ethanol
p-Nitrophenylpalmitat	Isopropanol
R-Methyldekansäure p-Nitrophenylester	Ethanol
S-Methyldekansäure p-Nitrophenylester	Ethanol

Die Berechnung der Substrathydrolyseraten wurde der Extinktionskoeffizient im verwendeten Puffersystem bestimmt. Dazu wurde reines p-Nitrophenol in Ethanol gelöst und in Enzymtestpuffer gegeben. Über das Lambert-Beersche Gesetz wurde der Extinktionskoeffizient ermittelt. Für das verwendete System ist der Extinktionskoeffizient 15.900  $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

Zur Bestimmung der esterolytischen Aktivität lipolytischer Enzyme auf Zelloberflächen wurden die zu untersuchenden Zellen angezogen und die Expression der relevanten Gene induziert (3.4.1 und 3.4.2). Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension abgenommen, pelletiert (13.000 Upm, 2 min) und in 1 ml Enzymtestpuffer resuspendiert. Zur Gewährleistung einer möglichst identischen Zellmenge bei jeder Messung wurde die optische Dichte der zu untersuchenden Proben bei 600 nm mit Enzymtestpuffer auf einen festen Wert eingestellt (0,5 bei *E. coli* Zellen und 0,3 bei Hefezellen). Als Referenz diente ein Ansatz mit Zellen, welche kein lipolytisches Enzym präsentierten. Bei Enzymtest mit oberflächenpräsentierten Lipasen wurden die Zellen vor der Messung abzentrifugiert (2 min 13000 Upm) und eine Endpunktbestimmung durchgeführt, da absetzende Zellen die Genauigkeit des Enzymtest stören. Gemessen wurde je 200  $\mu\text{l}$  im ELISA-Reader (GENios™, Tecan Trading AG, Mannedorf). Die Auswertung der Daten erfolgte in Microsoft Excel.

### **3.4 Zellbiologische Arbeitsmethoden**

#### **3.4.1 Induktion plasmidkodierter Genexpression in *E. coli***

Im Rahmen dieser Arbeit kamen Plasmide zum Einsatz, welche die regulierte Expression kodierter Gene erlauben. Verwendet wurden die lac-Promotorregion und die lac-Operatorregion, die tetA-Promotor/Operatorregion sowie ein T7-Promotor kombiniert mit einem lac-Operator.

Die Induktion der Transkription vom lac-Promotor aus wurde durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zu einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur von *E. coli* erreicht. Bei der Induktion von Esterase-Fusionsproteinen wurden die Zellen eine Stunde wachsen lassen. Bei der Überproduktion löslicher Proteine wurden die Zellen bis in die stationäre Phase vermehrt (4-16 Stunden).

#### **3.4.2 Induktion plasmidkodierter Genexpression in *S. cerevisiae***

Für die Oberflächenpräsentation von Proteinen in *S. cerevisiae* standen diese unter der Kontrolle des Galactose-Promotors. Zur Induktion der Proteine wurden die Hefezellen in entsprechendes flüssiges Medium überführt. Hierzu wurden die Zellen über Nacht bei 30 °C in SDCAA-Medium angezogen. Nach Abzentrifugieren der Zellen wurden diese mit SGCAA-Medium gewaschen. Zur Induktion wurde das Induktionsmedium (SGCAA-Medium) auf eine optische Dichte bei 600 nm von 1 angeimpft. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 30 °C angezogen.

#### **3.4.3 Immunfluoreszenzmarkierung von Mikroorganismen**

Zum Nachweis von Proteinen auf der Oberfläche von Mikroorganismen wurden diese über Immunfluoreszenz markiert. Hierzu wurden sowohl für das exponierte Protein spezifische Antikörper als auch Antikörper, welche an das zur Kontrolle eingefügte Epitope binden verwendet. Im Anschluss erfolgte die Fluoreszenzmarkierung über fluoreszenzmarkierte Antikörper oder Biotin-Phycoerythrin. Die Detektion erfolgte im FACS oder unter dem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop.

### 3.4.3.1 Immunfluoreszenzmakierung von *E. coli*

Zum Nachweis der zelloberflächenpräsentierten Proteine auf *E. coli* wurden diese über spezifische Antikörper und anschließender Immunfluoreszenzmarkierung angefärbt. Die Analyse der Färbung erfolgte im FACS.

Für die Färbung wurden 300  $\mu\text{l}$  einer induzierten Kultur pelletiert (13.000 Upm, 2 min, RT), in 10  $\mu\text{l}$  Antikörperlösung aufgenommen und für 10 Minuten mit dem Antikörper bei RT inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen mit 500  $\mu\text{l}$  PBS entfernt. Das Zellpellet wurde in 10  $\mu\text{l}$  eines entsprechenden Sekundärantikörpers aufgenommen und erneut 10 min inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden fluoreszenzmarkierte oder biotinylierte Antikörper verwendet. Im Falle eines biotinylierten Antikörpers wurden die Zellen nach erneutem Waschen in 10  $\mu\text{l}$  Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat aufgenommen und für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss erneut mit 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde das Zellpellet in einem letzten Schritt in 20  $\mu\text{l}$  sterilem PBS-Puffer aufgenommen. Alle Schritte mit Fluorophoren erfolgten abgedunkelt, um ein Ausbleichen zu vermeiden. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der markierten Zellen abgedunkelt auf Eis. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9:** Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immundetektion oberflächenpräsentierter Proteine auf *E. coli*.

Zielmolekül/Epitop	Primärantikörper [Verdünnung]	Sekundärantikörper
LipA <i>P.aeruginosa</i>	LipA Antikörper Serum 1 [1:40]	Anti-Kaninchen-Biotin
LipH	LipH Antikörper Serum [1:40]	Anti-Kaninchen-Biotin
E-Epitop	Anti-Etag Antikörper [1:10]	Anti-Maus-FITC; Anti-Maus-Biotin

### 3.4.3.2 Immunfluoreszenzmakierung von *S. cerevisiae*

Zum Nachweis der zelloberflächenpräsentierten Proteine auf *S. cerevisiae* wurde an das Fusionsprotein ein Myc-Epitop fusioniert, welches über eine spezifische Antikörper und anschließender Immunfluoreszenzmarkierung angefärbt. Die Analyse der Färbung erfolgte im FACS.

Für die Färbung wurden 100  $\mu$ l einer induzierten Kultur pelletiert (13000 Upm, 2 min, RT), in 100  $\mu$ l Antikörperlösung (Anti-Myc-Antikörper, Stammlösung 1:100 verdünnt) aufgenommen und für 10 Minuten mit dem Antikörper bei RT inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch 2-3 maliges Waschen mit 1000  $\mu$ l PBS entfernt. Das Zellpellet wurde in 100  $\mu$ l eines entsprechenden Sekundärantikörpers (Anti-Maus IgG, Biotin-Konjugat Stammlösung 1:100 verdünnt) aufgenommen und erneut 10 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Zellpellet in 50  $\mu$ l Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (1:50 verdünnt) aufgenommen und für 10 min inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss erneut drei Mal mit 1000  $\mu$ l PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde das Zellpellet in einem letzten Schritt in 20  $\mu$ l sterilem PBS-Puffer aufgenommen. Alle Schritte mit Fluorophoren erfolgten abgedunkelt, um ein Ausbleichen zu vermeiden. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der markierten Zellen abgedunkelt auf Eis.

### **3.4.4 Fluoreszenzmakierung von Mikroorganismen**

#### **3.4.4.1 Fluoreszenzmakierung von *E. coli* mit Tyramidestern**

Die Aktivitätsfärbung auf der *E. coli* Zelle über Tyramidester zur Phänotyp-Genotyp-Kopplung erfolgte wie unter 1.3.2.1 beschrieben. Für die Färbung wurden 1 ml induzierte *E. coli* Zellen abzentrifugiert und in PBS resuspendiert. Die Probe wurde im Photometer auf eine Zelldichte von 0,5 bei 600 nm eingestellt und 1 ml der eingestellten Probe wurde abzentrifugiert. Zunächst wurde die für die Reaktion notwendige Meerrettich-Peroxidase auf die Zelloberfläche konjugiert. Hierzu wurde das Zellpellet für eine Stunde unter leichtem Schütteln (300 Upm, Eppendorf Schüttler) in 150  $\mu$ l der oxidierten Peroxidase (3.3.5.1) inkubiert. Nicht gebundene Peroxidase wurde durch dreimaliges Waschen mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und in 1 ml „Tyramidreaktionspuffer“ (90 % (v/v) PBS; 10 % (v/v) 1 M Imidazol-Puffer, pH 7,8; 0,001 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aufgenommen. Durch die Zugabe des in DMF gelösten Substrats wurde der Enzymtest gestartet (Endkonzentration 1,14 nmol Tyramidester). Bei Markierungen mit R/S-Substraten wurden diese in Mischung bis zu einer Ester-Endkonzentration von 1,14  $\mu$ M eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der gewünschten



Zeit (5-60 Minuten) durch die Zugabe von 100  $\mu$ l 500 mM Tyraminlösung und anschließend waschen der Zellen mit 500  $\mu$ l PBS abgestoppt.

Die auf der Zelle gebundenen Produkte wurden für die FACS-Analyse über Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Hierzu wurden Streptavidin-Phycoerythrin und anti-Dinitrophenyl Antikörper-Alexafluor488-Konjugat verwendet. Die Zellen wurden in 10  $\mu$ l Fluoreszenzfarbstoff (1:10 verdünnt in PBS) aufgenommen und für 10 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 500  $\mu$ l PBS wurden die Zellen in 20  $\mu$ l PBS aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der markierten Zellen abgedunkelt auf Eis.

#### **3.4.4.2 Fluoreszenzmakierung von *S. cerevisiae* mit Tyramidestern**

Die Aktivitätsfärbung über Tyramidester zur Phanotyp-Genotyp-kopplung erfolgte bei Hefezellen ähnlich wie bei *E. coli* Zellen. Für die Färbung wurden 500  $\mu$ l induzierte *E. coli* Zellen abzentrifugiert und in PBS resuspendiert. Die Probe wurde im Photometer auf eine Zelldichte von 0,3 bei 600 nm eingestellt und 1 ml der eingestellten Probe wurde abzentrifugiert. Zu nächst wurde die für die Reaktion notwendige Meerrettich-Peroxidase auf die Zelloberfläche konjugiert. Hierzu wurde das Zellpellet für eine Stunde unter leichtem Schütteln (300 Upm, Eppendorf Schüttler) in 150  $\mu$ l der oxidierte Peroxidase (3.3.5.1) inkubiert. Nicht gebundene Peroxidase wurde durch drei- bis fünfmaliges Waschen mit 1 ml PBS gewaschen bis die Zelle keine Aggregate mehr bildeten. Die gewaschenen Zellenn wurden in 1ml „Tyramidreaktionspuffer“ (90 % (v/v) 100 mM PBS; 10 % (v/v) 1 M Imidazol-Puffer, pH 7,8; 0,001 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) aufgenommen. Durch die Zugabe des in DMF gelösten Substrats wurde der Enzymtest gestartet (Endkonzentration 1,14 nmol Tyramidester). Bei Markierungen mit R/S-Substraten wurden diese in Mischung bis zu einer Ester-Endkonzentration von 1,14  $\mu$ M eingesetzt. Die Reaktion wurde nach der gewünschten Zeit (5-60 Minuten) durch die Zugabe von 100  $\mu$ l 500 mM Tyraminlösung und anschließend dreimaligem waschen der Zellen mit je 1 ml PBS abgestoppt.

Die auf der Zelle gebundenen Produkte wurden für die FACS-Analyse über Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Hierzu wurden Streptavidin-Phycoerythrin und anti-Dinitrophenyl Antikörper-Alexafluor488-Konjugat verwendet. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l Fluoreszenzfarbstoff (1:100 verdünnt in PBS) aufgenommen und für 10 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml PBS wurden die Zellen in 20  $\mu$ l PBS aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der markierten Zellen abgedunkelt auf Eis.

#### **3.4.5 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von markierten *S. cerevisiae***

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden 5  $\mu$ l entsprechend markierter Zellen auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt. Das Deckgläschen wurde mit Nagellach auf dem Objektträger fixiert. Das Präparat wurde auf den Objektisch des inversen Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen, Germany)) arretiert. Für die Aufnahmen wurde die Funktion der Belichtungszeitautomatik der AxioVisionControl-Software verwendet, über die angeschlossene Kamera (CCD Kamera CV-M4+CL (JAI, Japan)) gesteuert wurde.

#### **3.4.6 Durchflußzytometrie und Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung**

Für durchflußzytometrische Analysen (FACS-Analysen) und fluoreszenzaktivierte Zellsortierungen wurde ein MoFlo-Zellsortiergerät (FACS) der Firma Dako Cytomation (heute: Fa. Beckman Coulter) verwendet. Der Strahlengang des FACS wurde unter Verwendung fluoreszierender MicroBeads (Fa. Beckman Coulter) justiert und fokussiert. Für die Analyse von *E. coli* Zellen wurde der Photomultiplier des *side scatters* auf einen Werte 750 eingestellt. Bei der Untersuchung der größeren Hefen wurde dieser Photomultiplier auf 600 eingestellt. Die Multiplier zur Detektion der Fluoreszenzsignale wurden auf je 600 eingestellt. Hierbei diente der Kanal eins (FL1) der Detektion des Fluoreszenzsignals von Alexafluor488 und der Kanal 2 (FL2) der Detektion des Fluoreszenzsignals von R-Phycoerythrin. Bei einer Tropfenfrequenz zwischen 95.000 und 100.000 pro Sekunde wurde die Anzahl der Ereignisse (Zellen) auf maximal 30.000 pro Sekunde begrenzt. Bei der Messung von *E. coli* Zellen wurden pro Analyse 300.000 Ereignisse vermessen. Hingegen wurden bei Hefezellen 100.000

Zellen vermessen. Die Datenaufnahme erfolgte mit dem Softwarepaket Summit® v4.0. Für die Auswertung und die Erstellung der Daten wurde neben dieser Software auch WinMDI Version 2.9 von Joseph Trotter verwendet.

Mit Hilfe der schon für die Justierung des Stahlgangs verwendeter MicroBeads wurde für Sortierungen der Tropfenabrisßpunkt des Flüssigkeitsstrahls eingestellt und die Tropfenverzögerung kalibriert. Sortiert wurde grundsätzlich im *single-sort*-Modus. Die gewünschten Zellenpopulationen wurden entweder in 5 ml Röhrchen sortiert oder mit Hilfe des CyClone-Einzelablagearms auf Agarplatten oder in Mikrotiterplatten vereinzelt. Für die Sortierung in Röhrchen wurde in die Röhrchen Puffer vorgelegt. Es konnten simultan zwei verschiedene Populationen in 5 ml Röhrchen sortiert werden. Die Frequenz der Ereignisse wurde bei Sortierungen zwischen 5.000 und 15.000 pro Sekunde bei einem Probedruck von 57 bis 59 psi gewählt.

Für die Bestimmung der oberflächenpräsentierten Moleküle pro Zelle wurden die Zelle mit abnehmenden Konzentrationen eines Antikörpers gefärbt. Durch Betrachtung der Fluoreszenzintensität wurde die Konzentration an Antikörper ermittelt, wo genau alle Moleküle auf der Zelle gefärbt wurden.

Unter der Annahme eines Molekulargewichts von 150.000 g/mol für den verwendeten Antikörper wurde die Konzentration der Oberflächen exponierten Proteine wie folgt berechnet:

$$\text{Anzahl der Moleküle} = \frac{\left( \frac{\text{Avogadro – Konstante } [\text{mol}^{-1}]}{\text{Molekulargewicht Antikörper } \left[ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]} \right) \cdot \text{Konzentration Antikörper } [\text{g}]}{\text{Anzahl der gefärbten Zellen}}$$

### 3.5 Phage-Display Methoden

#### 3.5.1 Phagen Selektionen

Für die Selektion von Bindemolekülen wurden 500  $\mu\text{l}$  der Phagenbibliothek (bereitgestellt von G. Habicht (Habicht *et al.* 2007)) für 30 Minuten zu 100  $\mu\text{l}$  mit TBS gewaschenen Dynabeads (M-280 Streptavidin, Invitogen) gegeben, um Streptavidin bindende Phagen aus zu selektieren. Das biotinylierte Zielprotein wurde zu 100  $\mu\text{l}$  gewaschenen Beads gegeben und für 20 Minuten unterschütteln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die mit Zielprotein beschichteten Beads wurde der präselektierte Phagenüberstand auf die Beads gegeben. Zuvor wurde der Phagen-Überstand mit 500  $\mu\text{l}$  Blocking-Lösung A oder Blocking-Lösung B versetzt. Die Blocking-Lösungen wurden alternierend zwischen den Selektionsrunden verwendet. Die Inkubation der Phagen mit dem Zielprotein erfolgte für 1 Stunde unter Schütteln. Die Beads wurden zehnmal mit TBS-T und zehnmal mit TBS gewaschen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass keine Restlösung bei den Beads verblieb. Die nach dem Waschen noch gebundenen Phagen wurden durch die Zugabe von 800  $\mu\text{l}$  HCL/Glycin pH 2,2 für exakt 8 Minuten eluiert. Der Phagenüberstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt in das 48  $\mu\text{l}$  2 M Tris vorgelegt wurden.

Die selektierten Phagen wurden für 45 Minuten zu einer vorbereiteten 25 ml *E. coli* XL1 Kultur gegeben und bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Für die spätere Auswertung der Selektion wurden hier Verdünnungsansätze hergestellt. Mit diesen wurde im Weiteren verfahren wie mit der Hauptkultur. Die transfizierten Zellen wurden abzentrifugiert (4.000 rpm) und das Pelett in 2 ml gewärmtem Medium aufgenommen. Die Suspension wurde auf mit Chloramphenicol versetzte LB-Platten (2 % Agar) ausplattiert. Die Platten wurden zuvor vorgewärmt auf 37 °C. Die transfizierten Zellen wurden nach über Nacht Inkubation bei 37 °C von den Platten geerntet. Die Platten der erstellten Verdünnungen wurden ausgezählt, um die Anreicherung der Phagen durch die Selektion zu betrachten.

### 3.5.2 Amplifikation monoklonaler Phagen und Phagenpools

Zur Herstellung der Phagenpools für weitere Selektionsrunden wurden die nach der Selektion geernteten Zellen mit dYT-Medium auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,1 eingestellt und bei 37 °C angezogen. Bei der Amplifikation von monoklonaler Phagen wurden eine Vorkultur über Nacht von einem Einzelklone angezogen und in 100 ml auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,1 überimpft.

Für die Transfektion mit dem Helferphagen wurden 100 ml auf eine  $OD_{600nm}$  von 0,5 bis 0,7 angezogen und mit einem Überschuss Helferphagen versetzt. Hierbei wurde die Zellzahl über die folgende Annahme kalkuliert:

$$OD_{600nm} = 1 \text{ entsprechen } 5 \cdot 10^8 \text{ Zellen/ml}$$

Die Kultur wurde für 30 Minuten ohne Schütteln inkubiert. Für die Induktion der Phagenamplifikation wurde IPTG zugegeben (Endkonzentration 1 mM) und die Kultur über Nacht unter schütteln (200upm) bei 37 °C inkubiert.

Die Kulturen wurden für 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugieren (4.000 upm) vom Medium entfernt. Die im Überstand enthaltenen Phagen wurden mit 2,5 ml 20 % PEG in 2,5 M NaCl-Lösung (auf 4 °C gekühlt) gefällt. Hierzu wurden diese eine Stunde auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 12.000 upm zentrifugiert. Das Pelett wurde nun erneut gewaschen. Hierzu wurden das Pelett in 17 ml TBS gelöst und im Anschluss mit 20 ml PEG-Lösung versetzt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurden die Phagen wie zuvor abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 1-8 ml sterilem TBS aufgenommen. Die Phagen wurden in Reaktionsgefäße je 100  $\mu$ l aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.5.3 Amplifikation von Helferphagen

Für die Selektion von Bindern über Phage-Display wurden Helferphagen benötigt, welche alle Informationen für die Phagenproduktion enthalten. Zur Amplifikation der Helferphagen wurden *E. coli* XL-1 Blue Zellen infiziert. Hierzu wurden 200  $\mu$ l *E. coli* Zellen mit einer  $OD_{600}$  von 0,2 mit 10  $\mu$ l einer Helferphagen-Stammlösung (VCS M13) versetzt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden in 3 ml Topagar (42 °C) aufgenommen und auf LB-Agar ausplattiert. Infizierte Zellen, welche anhand der geringen Zelldichte auf der Agarplatte erkannt werden konnten, wurden in 10 ml

Flüssigmedium (dYT-Medium mit 70 µg/ml Kanamycin) überimpft und über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugieren (4.000 upm) vom Medium, welches die Helferphagen enthielt, entfernt. Die Phagen wurden mit 2,5 ml 20 % PEG in 2,5 M NaCl-Lösung gefällt. Hierzu wurden diese eine Stunde auf Eis inkubiert und im Anschluss bei 12.000 upm zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 1 ml sterilem TBS aufgenommen. Der Titer der Phagenlösung wurde über die Infektionsfähigkeit bestimmt.

#### **3.5.4 Phage-ELISA**

Zur Identifikation von Bindern wurden zehn monoklonale Phagen mittels ELISA auf ihre Bindung untersucht. Hierzu wurde die Nunc Maxisorp Platte über Nacht mit dem Zielmolekül beschichtet. Hierzu wurden 5 µg des biotinylierten Zielmoleküles in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Kavität eingesetzt. Nach dreimal gewaschene Platte sowie die Phagen wurden für 1 Stunde mit Blockinglösung A behandelt. Hierzu wurden 100 µl Phagen mit 100 µl Blocking-Lösung versetzt. Das Blocken der Platte erfolgte mit je 300 µl 2-fach Blockinglösung pro Kavität. Die Platte wurde erneut dreimal gewaschen und es wurde 70 µl TBS in die Kavitäten vorgelegt bevor 30 µl Phagen—Lösung ebenfalls in die entsprechenden Kavitäten gegeben wurden. Die Inkubation der Phagen erfolgte für 1 Stunde. Nach fünfmaligem waschen mit TBS-T wurde anti-pVIII-HRP-Konjugat aus der Maus (1:2.000) in die Kavitäten gegeben und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte nach fünfmaligem waschen durch TMB-Substart (Promega). Die Färbung wurde nach 10-20 Minuten saurer abgestoppt. Die Signalstärke der einzelnen Phagen wurde am ELISA-Reader bei  $\lambda = 450$  nm gemessen.

## **4 Ergebnisse und Diskussion**

Die folgenden Kapitel zeigen die Entwicklung und experimentelle Überprüfung zellbasierter Hochdurchsatz-Verfahren zur Isolierung von Varianten löslicher lipolytischer Enzyme mittels Durchflusszytometrie. Vorgestellt werden zwei Ansätze zur Präsentation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von Mikroorganismen. Das erste vorgestellte Verfahren basiert auf der funktionalen Präsentation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen und konnte schon erfolgreich zur Präsentation von Lipasen und zur Selektion von enantioselektiven Varianten der Esterase A eingesetzt werden. Das zweite vorgestellte Verfahren basiert auf der funktionellen Oberflächenpräsentation von Proteinen auf Hefezellen. Für die beiden Verfahren der Oberflächenpräsentation ist das modifizierte ESCAPED-Verfahren (siehe hierzu 1.3.2.1) für die Genotyp-Phänotyp-Kopplung Gegenstand der einzelnen Unterkapitel. Neben der Präsentation und der experimentellen Überprüfung von Hochdurchsatz-Verfahren zur Isolierung von Varianten erläutern die Kapitel Grenzen und Möglichkeiten dieser Verfahren und vergleichen diese miteinander.

### **4.1 *E. coli*-basierte Oberflächenpräsentation von Proteinen**

#### **4.1.1 Untersuchungen der Lipase A aus *P. aeruginosa* und deren zugehöriger Foldase LipH**

Die Lipase A (LipA) aus *Pseudomonas aeruginosa* ist ein Modellenzym der gerichteten Evolution bezüglich der Enantioselektivität von Lipasen (siehe auch 1.4). Dieses Kapitel untergliedert sich in die funktionelle Präsentation von LipA und deren Variante LipA<sub>1H8</sub> auf *E. coli* Zellen sowie Untersuchungen zur Bindung zwischen LipH und LipA. Im Weiteren enthält dieses Kapitel einen Exkurs zur Selektion und Charakterisierung eines cameloiden Antikörpers zur Detektion der Foldase LipH.

#### 4.1.1.1 Expression der Lipase A und der Foldase aus *P. aeruginosa*

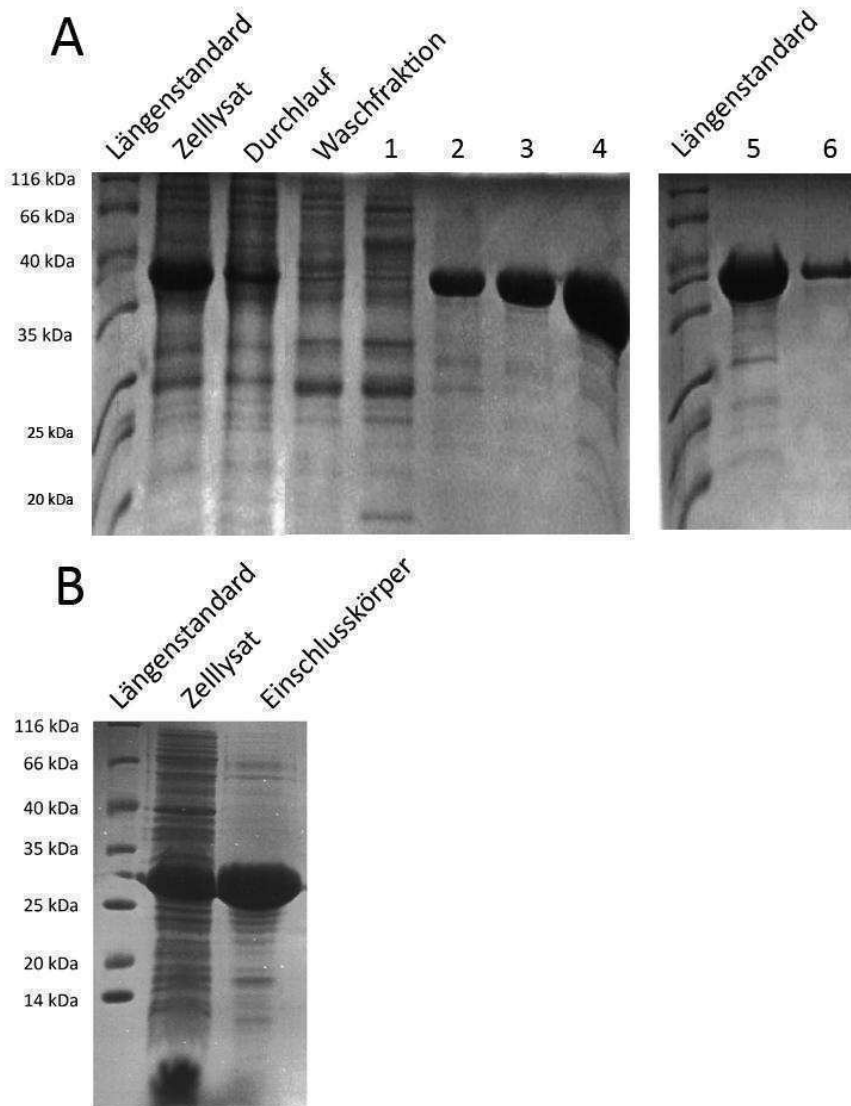
Für die Untersuchungen an der Lipase A und deren Foldase wurden diese neben der Oberflächenpräsentation löslich exprimiert. Hierzu wurden die am Forschungszentrum Jülich von Schneidinger (1997) und Hausmann (2008) etablierten Expressionen für LipA und LipH verwendet. In vergleichenden Expressionsstudien konnte eine Steigerung der Ausbeute bei Verwendung von *E. coli* Origami(DE3) pLys gezeigt werden (Daten nicht gezeigt.).

Die Expression der Lipase A erfolgte im Schüttelkolben in mit pLipA-SS transformierten *E. coli* Origami(DE3) pLys. Die Induktion erfolgte mit IPTG bei einer  $OD_{600nm} = 0,3$  über Nacht. Im Anschluss wurde die als Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) anfallende Lipase A von den restlichen Zellbestandteilen befreit und in 8 M Harnstoff aufgenommen (3.3.1.2). Die Expression sowie die Separation der Zellbestandteile wurde über SDS-PAGE (3.3.2.1) verfolgt (Abbildung 12 A).

Die Überexpression und Reinigung der Foldase LipH erfolgte als N-terminale His-Tag Fusion. Die Foldase LipH wurde hierzu um den Membrananker verkürzt, so dass sie löslich vorlag. Für den Membrananker konnte für Foldasen gezeigt werden, dass dieser keinen Einfluss auf die Aktivierung der Lipase besitzt (Shibata *et al.* 1998; Quyen *et al.* 1999; El Khattabi *et al.* 2000). Die Reinigung der Foldase erfolgte durch IMAC-Reinigung. Die Expression und die Reinigung wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 12 B). Die Fraktionen, welche die Foldase enthielten, wurden gepoolt und gegen Lipase Rückfaltungspuffer dialysiert, um Imidazol aus der Probe zu entfernen, da dieses im photometrischen Aktivitätstest zu einer Hydrolyse des Substrats und somit zu einem Anstieg der Absorption führt.

Aus einem Liter Kulturvolumen konnten 119 mg LipA und 91 mg LipH gereinigt werden. Im Vergleich der Expression in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* Origami(DE3) pLys zeigte sich eine Erhöhung der Ausbeute um einen Faktor 1,5 für LipA um einen Faktor 1,4 für LipH in *E. coli* Origami(DE3) pLys.





**Abbildung 12:** SDS-PAGE nach Überexpression der Lipase A (B) und der Foldase (A) in *E. coli* Origami(DE3) pLys unter Kontrolle des T7-Promotors in dYT-Medium

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das Trenngel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. A) Reinigung von LipHt-NHis durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC): Längenstandard; Zelllysat nach erfolgter Überexpression; Durchlauf; Waschfraktionen; 1-6 Elutionsfraktionen mit steigender Imidazolkonzentration (20 mM, 40 mM, 60 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM Imidazol). B) Längenstandard; Zelllysat nach erfolgter Überexpression; Einschlusskörper nach Entfernen der Zelltrümmer.

Zur Bestätigung der Proteine wurde nach der ersten Expression eine Western Blot-Analyse mit dem jeweiligen für das Protein spezifischen Antikörperserum durchgeführt: Die Reinigung konnte hierdurch bestätigt werden. Für LipA zeigte sich eine Bande bei ca. 29 kDa und für LipH zeigte sich eine Bande bei ca. 37 kDa (Daten nicht gezeigt). Die Aktivität der gereinigten Lipase sowie der Foldase wurde durch photometrische Aktivitätsmessung auf ihre Funktionalität untersucht. Abbildung 13 zeigt eine Beispielmessung eines Aktivitätstest. Als Negativ-Kontrolle wurde je Lipase und die Foldase einzeln vermessen.

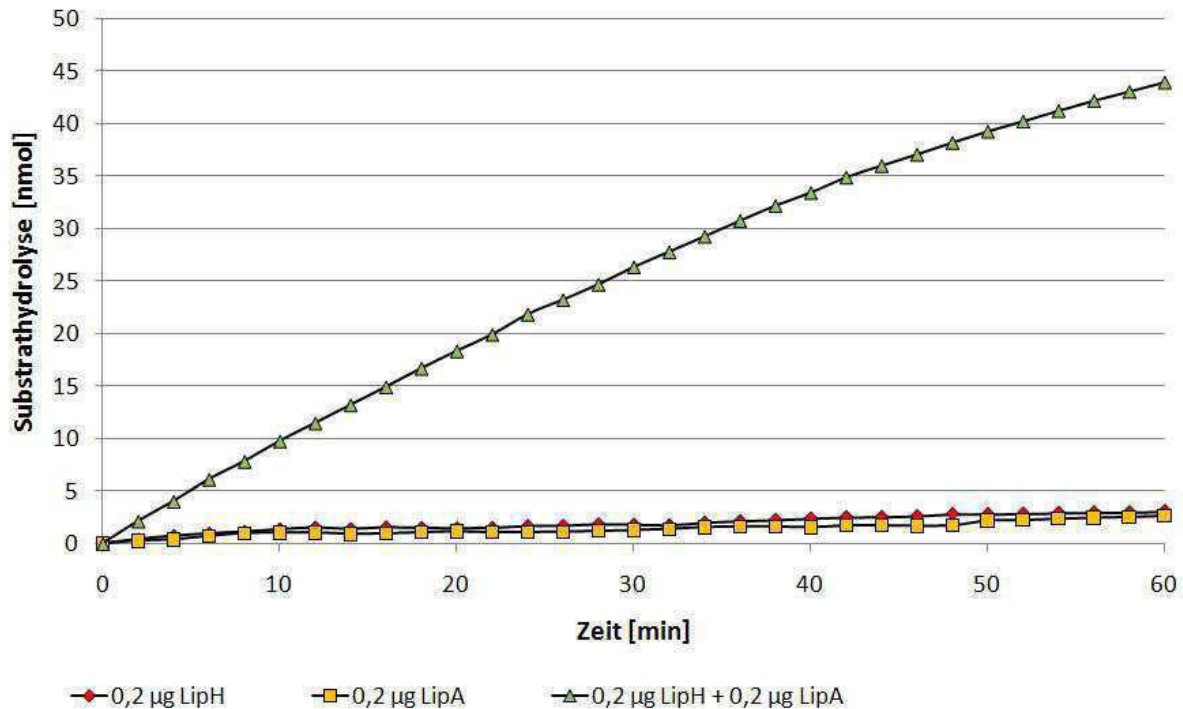


Abbildung 13: Photometrischer Aktivitätstest von löslichem LipA (Lipase) und LipH (Foldase). Als Substrat wurde p-Nitrophenolcaprylat verwendet. Die Messung erfolgte kontinuierlich alle 2 Minuten. Als Negativ-Kontrolle wurden die Lipase (LipA) und die Foldase (LipH) einzeln vermessen.

#### 4.1.2 Oberflächendisplay der Lipase A und der Foldase H auf *E. coli*

Das Prinzip der Oberflächenpräsentation mittels EstA Autotransporter ist bereits erfolgreich für *Fusarium solani pisi* Cutinase (214 AS), *Serratia marcescens* Lipase (613 AS) und *Bacillus subtilis* Lipase (181 AS) beschrieben worden. Alle drei Passagierenzyme weisen auf der Zelloberfläche von *E. coli* lipolytische Aktivität auf. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das für EstA etablierte ESCAPD-Verfahren (1.3.2.1) auch bei diesen Enzymen möglich ist (Becker *et al.* 2005). Die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert. Da sie ein Modellenzym der gerichteten Evolution darstellt, bietet sie die Möglichkeit, herkömmliche Verfahren der Optimierung mit dem auf *E. coli* Zellen basierenden Hochdurchsatzverfahren zu vergleichen. Insbesondere der Vergleich der mit herkömmlichen Verfahren (Enzymassay mit Mikrotiterplatten) erhaltenen enantioselektiven Variante der Lipase mit der wildtyp Lipase im Oberflächendisplay ist von besonderem Interesse zur näheren Charakterisierung des Systems.

In der evolutiven Optimierung lautet ein wichtiger Leitsatz: „*You get what you screen for*“ (Kuchner und Arnold 1997). Dieser Satz beschreibt sehr treffend die Anforderungen an ein *Screening*-System und die Notwendigkeit, das verwendete System genau zu kennen.

Hierbei stellt sich für das verwendete System die Fragen in wie weit der Autotransporter die Funktionalität des Enzyms beeinflusst.

Neben der Charakterisierung des Systems ist des Weiteren die Co-Expression der Lipase und der Foldase von Interesse, um die spezifische Aktivierung der Lipase durch gerichtete Evolution beider Moleküle näher zu verstehen. Für die Foldase wurde bereits gezeigt, dass sie funktionsfähig auf der Oberfläche von *E. coli* präsentiert werden kann (Wilhelm *et al.* 2007b).

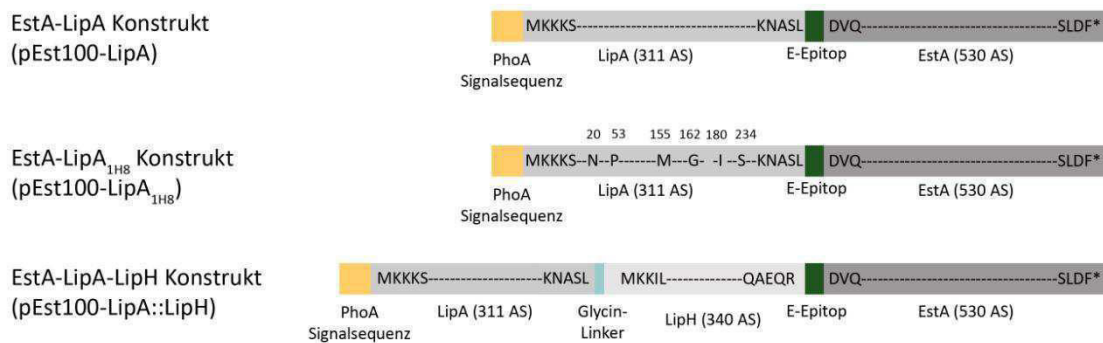
#### **4.1.2.1      Oberflächendisplay der Lipase A**

Für die Charakterisierung des *E. coli* Display-Systems wurden die wildtyp Lipase (LipA) sowie deren enantioselektive Variante LipA<sub>1H8</sub> (1.4) in den pEst100-Vektor kloniert.

Die Variante LipA<sub>1H8</sub> wurde für die Hydrolyse von 2-Methyldekansäure-*p*-Nitrophenol evolutiv optimiert (siehe auch 1.4). Der Wildtyp sowie die Variante präferieren das S-Enantiomer, wobei der Wildtyp einen E-Wert von 1,1 und die Variante einen E-Wert von 51 aufweist. Dies beruht auf sechs Aminosäuresubstitutionen (D20N, S53P, S155M, L162G, T180I und T234S), welche zu einer Umorganisation der Bindetasche führen (Reetz *et al.* 2007).

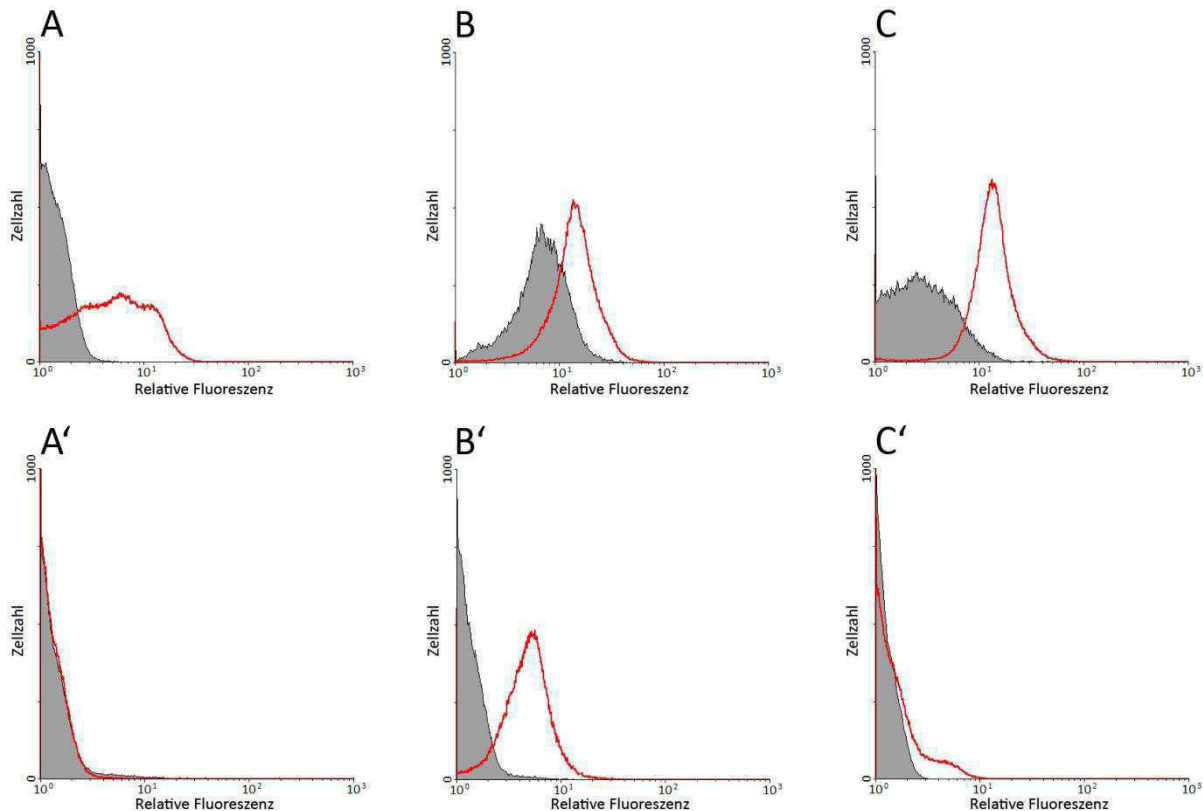
Das wildtyp Enzym und die gut charakterisierte Variante geben die Möglichkeit, den Einfluss des EstA-Membranankers bezüglich der Enantioselektivität zu untersuchen. Des Weiteren wurde für die enantioselektive Variante bei der löslichen Expression in *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt, dass die Mutationen die Sekretion beeinflussen. Dies wurde auf die Aminosäure T180 zurückgeführt, die sich in unmittelbarer Nähe der Interaktionsstelle mit dem Xcp-Apparat befindet. Dies wurde bisher jedoch nicht experimentell bestätigt (Sascha Hausmann 2008). Hierbei stellt sich die Frage, ob die Mutationen auch den Transport in das Periplasma von *E. coli* und den Transport an die Oberfläche durch den Autotransporter beeinflussen.

Des Weiteren wurde von Professor Jägers Arbeitsgruppe in Jülich (Forschungszentrum Jülich; IMET) ein aktives Fusionsprotein bestehend aus Foldase und Lipase in den pEst100-Vektor (pEst100-LipA::LipH) kloniert und für Messungen zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Proteinkonstrukte sind in Abbildung 14 dargestellt.



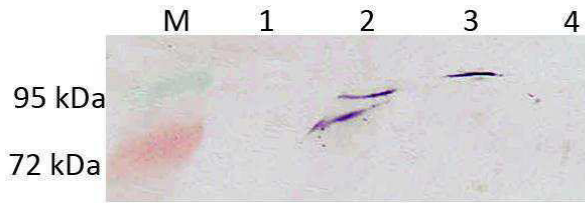
**Abbildung 14: Konstrukte zur Oberflächenpräsentation der Lipase A**  
Verwendete LipA-EstA\* Konstrukte zur Oberflächenpräsentation, welche in den Vektor pEST100 kloniert wurden: LipA (wildtyp Enzym), LipA<sub>1H8</sub> (enantioselektive Variante) und LipA::H (Fusionsprotein).

Der Nachweis der Oberflächenpräsentation wurde zunächst für das wildtyp Enzym durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen, welche über Immunofärbung und FACS-Analysen erfolgten, zeigte sich, dass die Lipase bei *E. coli* B Stämmen (BL21 (DE3) und JK321) an der Oberfläche exponiert vorlag, jedoch nicht im Stamm JM109 (DE3), welcher zu den *E. coli* K Stämmen gehört (siehe Abbildung 15). Für den Nachweis der Oberflächenpräsentation wurden das Lipase spezifische, polyklonale anti-LipA Serum aus dem Kaninchen sowie der monoklonale anti E-tag Antikörper verwendet. Das Epitop für diesen monoklonalen Antikörper befindet sich zwischen Membrananker und Enzym und dient ebenfalls zur Betrachtung der Expression auf der Oberfläche. Für diese Färbung konnte auch in JM109 (DE3) Zellen ein positives Signal erhalten werden. Zunächst wurde vermutet, dass die Disulfidbrücke oder die mit der Komplexierung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Iones einhergehende Strukturbildung des Enzyms den Export des Enzyms durch den Membrananker behindert. Diese Hypothese konnte jedoch widerlegt werden, da sich weder bei der erzeugten Mutante ohne Disulfidbrücke noch bei der Anzucht mit EGTA bzw. DTT eine Präsentation des Enzyms nachweisen lies (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 15: FACS-Analyse der Oberflächenpräsentation von LipA in verschiedenen *E. coli* Stämmen**  
 A-C zeigen die Immunofärbung des LipA-EstA-Fusionsproteins über das sich zwischen EstA und LipA befindliche E-Epitop. Die Abbildungen A'-C' zeigen die Immunfärbungen über anti LipA-Antikörper. A-A') In Rot: JM109 (DE3) pEst100-LipA, in Grau: JM109 (DE3) pEst100. B-B') In Rot: BL21 (DE3) pEst100-LipA in Grau: BL21 (DE3) pEst100. C-C') In rot: JK321 pEst100-LipA in Grau: JK321 pEst100.

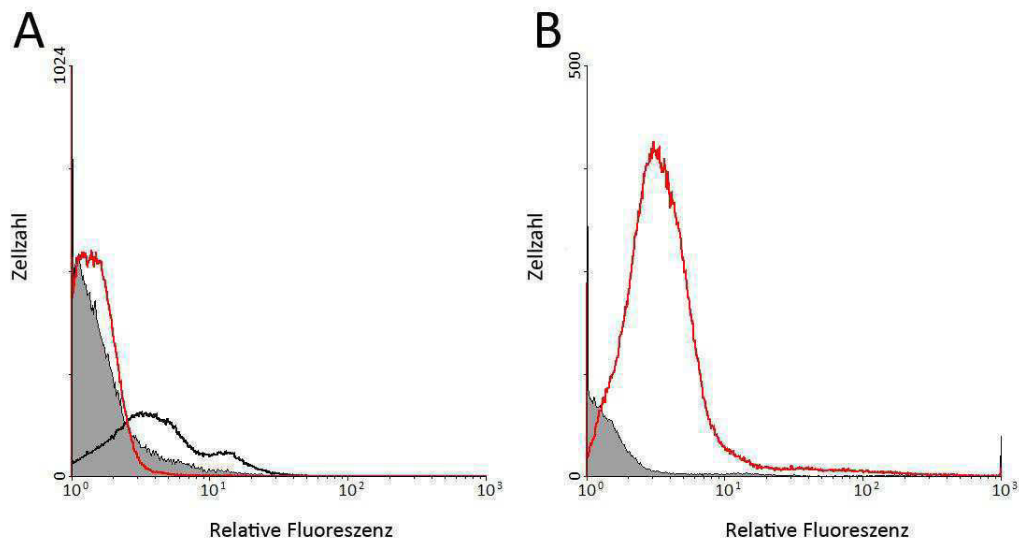
Im Vergleich mit JM109 (DE3) besitzen die verwendeten *E. coli* B Stämme keine OmpT-Protease auf der Zelloberfläche. Eine für die OmpT-Protease mögliche Spaltstelle (XR↓(R/K)X) konnte in der Sequenz von LipA ausgemacht werden. Um die Hypothese der Spaltung von LipA auf der Oberfläche zu bestätigen, wurden die Proteine der Membran isoliert und eine Western Blot-Analyse durchgeführt (Abbildung 16). Hierbei bestätigte sich die Annahme der OmpT-Spaltstelle. Das aus JM109 isolierte EstA-LipA-Fusionsprotein weist eine Bande bei ca. 100 kDa auf. Hingegen zeigten sich bei dem Isolat aus BL21 Zellen zwei Banden, welche im Vergleich zur Bande des JM109 Isolates verkürzt sind. Der Aminosäurekontext, welcher die OmpT-Protease um die Spaltstelle akzeptiert, ist hoch variabel. Im Vergleich zu den beschriebenen Sequenzen, die bevorzugt von der Protease gespalten werden, weicht die Sequenz um die Spaltstelle bei LipA deutlich von diesen ab (McCarter *et al.* 2004). Es ist zu vermuten, dass die effiziente Spaltung der Lipase auf der Oberfläche auf Grund der Fixierung auf der Oberfläche erfolgt.



**Abbildung 16: Western Blot-Analyse der LipA-EstA-Fusion**

Der Auftrag ist wie folgt: 1) JM109 (DE3) 2) JM109 (DE3) pEst100-LipA 3) BL21 (DE3) pEst100-LipA 4) BL21(DE3)

Für den Nachweis der Oberflächenpräsentation des Fusionsproteins aus LipA und LipH wurde die Probe mittels Immunofärbung im FACS untersucht (Abbildung 17). Die Immunofärbung von LipA zeigte hierbei kein deutliches Signal in der Färbung. Ursache hierfür könnte das fusionierte LipH sein, welches an die Lipase bindet. Das oberflächenexponierte LipH lässt sich über Immunofärbung nachweisen.



**Abbildung 17: FACS-Analyse der oberflächenexponierten LipA-H Fusion**

A) Immunofärbung mit anti-LipA Antikörper. In Grau: BL21(DE3) pEst100 (Negativ-Kontrolle), in Schwarz: BL21 (DE3) pEst100-LipA (Positiv-Kontrolle) und in Rot BL21(DE3) pEst100-LipA::H. B) Immunofärbung mit anti-LipH Antikörper. In Grau BL21(DE3) pEst100 (Negativ-Kontrolle) und in Rot BL21(DE3) pEst100-LipA::H.

Da Unterschiede bezüglich der Faltungskinetiken, gefalteten Strukturen oder konformationellen Stabilitäten einen Einfluss auf die Effizienz der Oberflächenpräsentation besitzen können, wurde die Nettoakkumulation von LipA und der Variante LipA<sub>1H8</sub> auf der Bakterienoberfläche untersucht. Hierzu wurde die gleiche Menge an induzierten Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von E-Tag Antikörpern gefärbt und im FACS vermessen. Mit steigender Antikörperkonzentration nimmt das Fluoreszenzsignal bis zur Sättigung immer weiter zu. Über die Antikörperkonzentration am Punkt der Sättigung kann die Anzahl der Moleküle

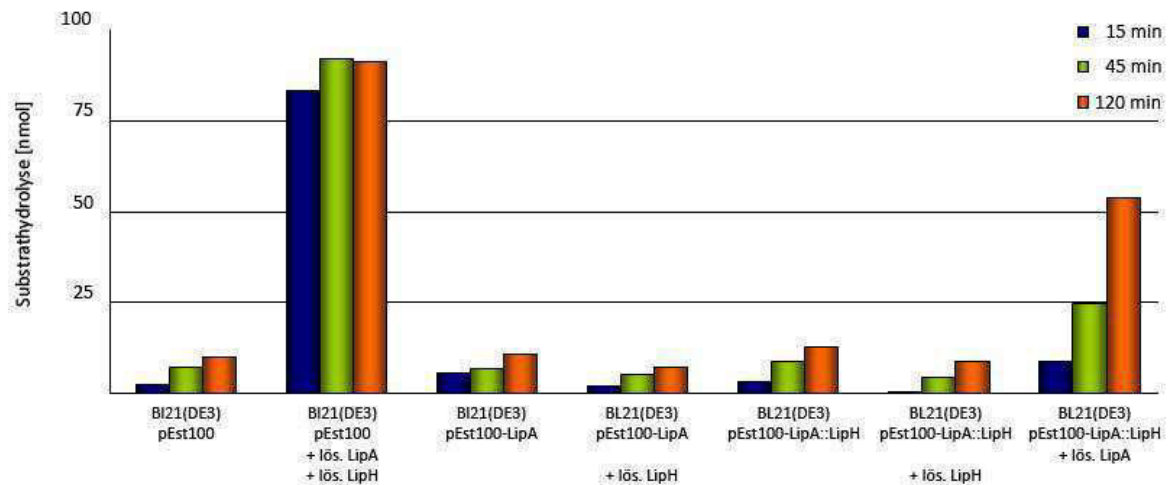
bestimmt werden, da einem Molekül gebundenem Antikörper ein oberflächenpräsentiertes Molekül entspricht (siehe auch 3.4.6). Die Sättigung erfolgte bei beiden Proben bei ca.  $0,2 \mu\text{g}$  anti-Etag Antikörper. Somit wurden  $8 \cdot 10^{11}$  Moleküle Antikörper gebunden. Die Proben enthielten ca.  $5 \cdot 10^8$  Zellen. Daraus folgt, dass ca. 1600 Moleküle auf der Oberfläche exponiert sind. Obwohl die Variante LipA<sub>1H8</sub> sechs Aminosäureaustausche aufweist und in *P. aeruginosa* eine schlechtere Sekretion zeigt, wird die Nettoakkumulation auf der Bakterienoberfläche dadurch nicht beeinflusst. Im Vergleich zur Anzahl an EstA Molekülen ohne Passagierprotein sind um einen Faktor 20 weniger Moleküle auf der Oberfläche exponiert. Dies könnte mit der Faltung der Lipase zusammenhängen, da im Periplasma nicht korrekt gefaltete Proteine proteolytisch gespalten werden.

#### **4.1.2.2 Funktionelle Analyse der oberflächenexponierten Lipase A**

Nach erfolgreicher Präsentation der Lipase auf der Oberfläche wurde die Analyse der Aktivität durchgeführt. Diese erfolgte neben dem präsentierten wildtyp Enzym auch mit oberflächenpräsentiertem LipH-LipA Fusionsenzym. Für den Nachweis der Aktivität wurden Endpunktbestimmungen zu verschiedenen Zeitpunkten in einem photometrischen Enzymtest mit *p*-Nitrophenylcaprylat durchgeführt. Alle Zellen wurden für die Aktivierung der Lipase für 30 Minuten in Lipaserückfaltungspuffer vor inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden BL21 (DE3) pEst100 Zellen, welche den inaktiven Membrananker ohne lipolytisches Enzym präsentieren, verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurden BL21 (DE3) pEst100 Zellen lösliches LipA und lösliches LipH zugegeben. Lediglich die Positiv-Kontrolle und die Probe BL21 (DE3) pEst100-LipH::A mit löslichem LipA zeigen Substrathydrolyse (Abbildung 18).

Daraus lässt sich schließen, dass sowohl die N-terminale Fusion von LipA als auch die C-terminale Fusion des Membranankers keinen Einfluss auf die katalytische Wirkung der Foldase haben. Der ansonsten zu beobachtende Anstieg der Substrathydrolyse in den Proben beruht auf der Autokatalyse des Substrats.

Hierbei stellt sich die Frage, ob die Fusion der Lipase an den Membrananker die Bindung und somit die Aktivierung der Lipase behindert. Daher soll im Folgenden die Bindung der Foldase an die oberflächenexponierte Lipase untersucht werden (siehe 4.1.2.3).



**Abbildung 18: Photometrische Bestimmung der Aktivität der oberflächenexponierten Lipase (LipA) durch Endpunktbestimmungen nach 15, 45 und 120 Minuten**  
 Als Kontrolle wurden BL21(DE3) pEst100 Zellen verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurden lösliches LipA und LipH dieser Probe zugegeben.

Neben der Bindung der Foldase und der damit einhergehenden Aktivierung der Lipase könnte der nicht korrekt gefaltete Zustand der Lipase auf der Oberfläche dazu führen, dass im Periplasma vermehrt LipH-LipA Fusionsenzym hydrolysiert wird und nicht an die Oberfläche gelangt. Die für LipA bestimmte Anzahl an Molekülen auf der Oberfläche (4.1.2.2) ist im Vergleich zur Präsentation von EstA ohne Passagierdomäne deutlich niedriger. Durch die geringe Anzahl der Moleküle könnte somit der Nachweis der Aktivität nicht möglich sein, da eine zu geringe Anzahl an aktiven Molekülen vorliegt und somit die lipolytische Hintergrundaktivität der Zellen das Signal verdeckt. Um diesem Abbau im Periplasma entgegenzuwirken, wurde zunächst LipH periplasmatisch zum LipA-EstA-Fusionsprotein co-exprimiert und die Aktivität vermessen (Daten nicht gezeigt.). Im Folgenden wurde neben LipA über das Intimin-System die Foldase auf der Oberfläche co-exprimiert (Diplomarbeit Sebastian Reichert, Wentzel *et al.* 2001). Beide Co-Expressionen wurden photometrisch auf Aktivität untersucht. Hier konnte keine Aktivität von LipA festgestellt werden. Alle Konstrukte wurden auf Tributyrin-Platten auf lipolytische Aktivität untersucht. Hier konnte ebenfalls keine Aktivität festgestellt werden.



Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Lipase LipA nicht auf *E. coli* Zellen durch die Zugabe der löslichen Foldase aktiviert werden kann, beziehungsweise dass die Aktivität unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methoden liegt. Anders verhält es sich mit der Foldase LipH. Diese kann die Lipase sowohl N-terminal als auch C-terminal auf der Oberfläche präsentiert aktivieren.

#### 4.1.2.3 Untersuchung der Bindung zwischen Foldase und Lipase

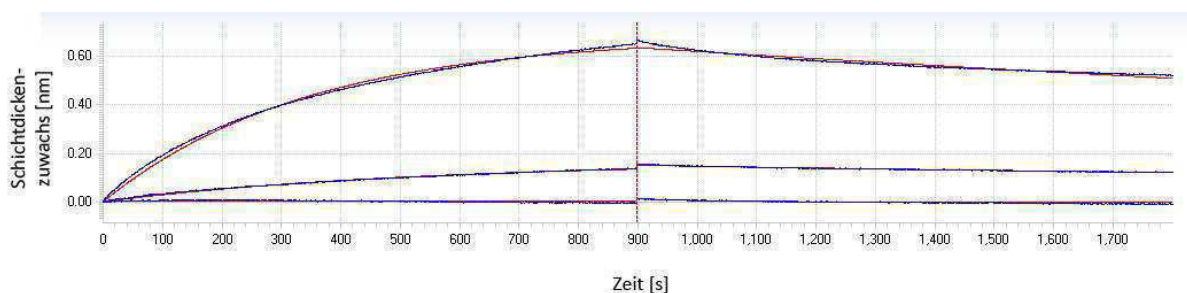
Für die Aktivierung der Lipase ist die Faltung durch LipH notwendig. Aus den vorigen Versuchen ergibt sich die Frage, ob die Lipase als EstA-Fusionsprotein nicht in den aktiven Zustand von der Foldase überführt werden kann. Die Bindung von LipH an die exponierte Lipase wurde über immunologische Färbung und FACS-Analyse analysiert. Für diese Messung wurde zunächst die Interaktion zwischen Enzym und Faltungshelfer mittels *Bio-Layer Interferometry* (BLI) untersucht.

##### 4.1.2.3.1 Untersuchung der Bindung zwischen LipH und der Lipase mittels *Bio-Layer Interferometry* (BLI)

Die Interaktion der Lipase und der Foldase LipH wurde zunächst mit löslichem Protein mittels *Bio-Layer Interferometry* (BLI) untersucht. Für die Bestimmung wurde biotinylierte LipH an Streptavidin-Tips immobilisiert und die lösliche Lipase in verschiedenen Konzentrationen in Lösung eingesetzt. Das Sensogramm sowie die Dissoziationskonstante wurden mit Hilfe der Software ForteBio Data Acquisition 6.3 aus den primären Sensogrammen der Kontrollmessung und der mit LipH beschichteten Streptavidin-Tips erstellt (Abbildung 19). Die Bindungskinetik ergab eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von 0,16 nM ( $k_{on} = 1,45 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{dis} = 2,5 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ ). Die  $K_D$  errechnet sich wie folgt aus der Assoziationsrate  $k_{on} [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$ , welche angibt, wie viele Moleküle pro Zeiteinheit an das Zielmolekül binden, und der Dissoziationsrate  $k_{dis} [\text{s}^{-1}]$ , welche die Zeit für die Dissoziation des Zielmoleküls angibt:

$$K_D[\text{M}] = \frac{k_{dis}[\text{s}^{-1}]}{k_{on}[\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]}$$

Die Affinität ist umso größer, je höher die Assoziationsrate und je kleiner die Dissoziationsrate eines Binders ist. Die typische  $K_D$  für die Bindung von therapeutischen Antikörpern beträgt zwischen 0,1-10 nM. Die für die Interaktion zwischen LipH und LipA bestimmte Dissoziationskonstante ist somit mit einem Antikörper vergleichbar. Die erhaltenen Daten decken sich mit den für die Lipase aus *B. glumae* bestimmten Werte ( $K_D = 5$  nM) (Pauwels *et al.* 2006) und bestätigen die in der Literatur für die Interaktion gezeigten Daten für lösliche Foldasen (Hobson *et al.* 1995; Shibata *et al.* 1998).



**Abbildung 19: Sensogramm der Bindung zwischen LipH und LipA**

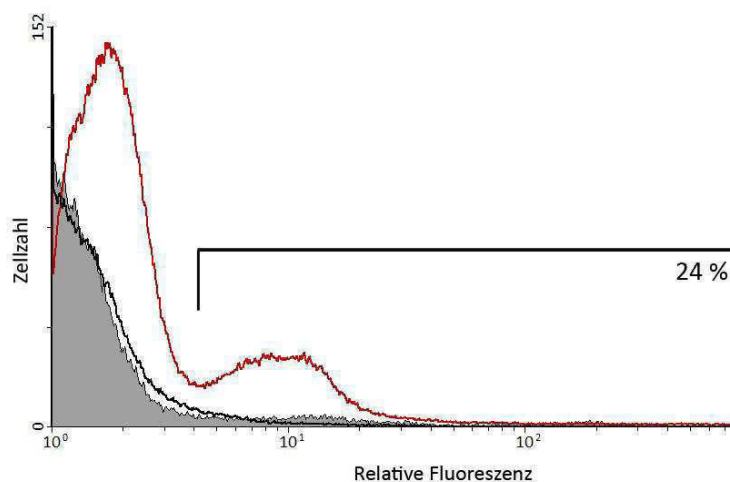
Die Kurven zeigen die Messungen mit 200 µM, 100 µM und 50 µM VHH LipH8 nach Abzug der Referenz. In Rot ist die vom Programm für die Bestimmung der Bindekonstante ermittelte Bindekurve dargestellt. Für die Bestimmung wurden die Werte der oberen und der mittleren Kurve verwendet.

Die in diesem Experiment gezeigte starke Interaktion zwischen der Lipase und der Foldase und die schon bekannten Daten für die Lipase und die Foldase aus *B. glumae* lassen daraufschließen, dass an der Freisetzung der Lipase weitere Proteine beteiligt sind. Hierbei könnte der Xcp-Apparat, welcher die Lipase in das extrazelluläre Medium sekretiert eine entscheidende Rolle spielen (Tommasen *et al.* 1992, Lazdunski *et al.* 1996 und Filloux *et al.* 1998).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Bindung des für die FACS-Färbungen verwendeten Antikörpers an LipH die Interaktion beeinflusst. Hierzu wurden der mit LipH beschichtete *Tip* nach der Bindung von LipA in Antikörperlösung getaucht und die Assoziation bzw. die Dissoziation beobachtet. Da das Signal weiter zunahm, kann davon ausgegangen werden, dass die Bindung des anti LipH-Antikörpers aus der Maus, welcher zur Detektion von LipH auf den Zellen mittels FACS-Analyse verwendet wurde, die Interaktion nicht stört (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2.3.2 Untersuchung der Bindung zwischen LipH und der Lipase mittels Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der Bindung von LipH auf oberflächenexponiertem LipA wurden die induzierten BL21 (DE3) pEst100-LipA Zellen für zehn Minuten mit löslichem LipH inkubiert. Im Anschluss wurde eine Immunofärbung mit dem polyklonalen anti-LipH-Antikörper (Kaninchen) durchgeführt. Als Kontrolle wurden, neben BL21 (DE3) pEst100-LipA Zellen ohne Vorinkubation mit LipH, BL21(DE3) pEst100 Zellen verwendet, welche den EstA-Membrananker präsentieren. Diese wurden ebenfalls mit löslichem LipH vorinkubiert, um ein mögliches unspezifisches Binden von LipH an den EstA-Membrananker auszuschließen. Das FACS-Diagramm (Abbildung 20) der drei Messungen zeigt, dass LipH spezifisch an die LipA-präsentierenden Zellen (in Rot dargestellt) bindet. Die beiden Negativ-Kontrollen zeigen keine Fluoreszenz und somit keine Bindung (in Grau: (BL21(DE3) pEst100 mit löslichem LipH vorinkubiert und in Schwarz: BL21(DE3) pEst100-LipA).



**Abbildung 20:** Untersuchung der Bindung von LipH an oberflächenexponiertes LipA durch Immunofärbung (LipH-Antikörper) und Analyse der Proben mittels FACS-Analyse  
In Grau: BL21(DE3) pEST100 mit löslichem LipH vorinkubiert, in Schwarz: BL21(DE3) pEst100-LipA ohne Zugabe von LipH und in Rot pEst100-LipA mit löslichem LipH vorinkubiert. Von den mit LipH vorinkubierten Zellen zeigt eine Population von 24 % eine deutliche Färbung und somit eine Bindung der Foldase LipH.

Aus diesen Befunden ergibt sich, dass die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* sich wie andere Lipasen auf der Oberfläche von *E. coli* durch das Fusionsprotein EstA präsentieren lässt. Die spezifische Foldase kann auf der Oberfläche an die Lipase binden. Hierbei scheint es jedoch zwei verschiedene Zellpopulationen zu geben. Obwohl das lösliche Protein LipH im Überschuss zu den LipA präsentierenden Zellen

gegeben wurde, sind lediglich 24 % der Zellen positiv gefärbt. Hingegen zeigen die präsentierenden Zellen in der FACS-Analyse eine einzige Population in der anti-LipA und in der anti E-tag Färbung (Abbildung 15 B und B'). Dies lässt vermuten, dass nur ein Teil des oberflächenpräsentierten Enzyms im nahenativen Zustand vorliegt. Für diese Vermutung spricht die Detektion zweier Populationen bei der Immunofärbung auf LipA-Präsentation (siehe Abbildung 17). Nur dieser Teil kann durch die Foldase gebunden und somit in den aktiven Zustand überführt werden.

Um die Anzahl der aktiven Moleküle abschätzen zu können, wurden im Weiteren mit diesen induzierten Zellen die Anzahl der oberflächenpräsentierten LipA-Moleküle pro Zelle ermittelt. Hierzu wurden die induzierten Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an E-tag Antikörper gefärbt und die Konzentration an Antikörper ermittelt, an dem jedes Molekül der EstA-LipA-Fusion auf der Zelle gefärbt ist. Über die Anzahl der gefärbten Zellen, die ermittelte Konzentration des Antikörpers sowie das Molekulargewicht des Antikörpers (siehe auch 3.4.6) konnte eine Anzahl von 1600 EstA-LipA-Fusions-Moleküle pro Zelle ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Anhand der Daten lässt sich folgendes Gedankenexperiment ableiten:

Geht man davon aus, dass die Lipase bei 24 % der präsentierten Zellen durch die Bindung an die Foldase in den aktiven Zustand überführt wurde, so ergibt dies 380 aktive LipA-Moleküle pro Zelle. Berechnet man nun unter Einbeziehung der Avogadrozahl

$(6,02214129 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1})$  und der Anzahl der Zellen pro Enzymansatz ( $5 \cdot 10^8$  Zellen pro ml) wie viel mol Enzym pro Testansatz enthalten sind, so erhält man  $3,16 \cdot 10^{-13} \text{ mol/ml}$  (0,316 pmol/ml).

Zum Vergleich wurden im photometrischen Aktivitätstest mit löslichem Enzym eine Enzymkonzentration von  $0,2 \text{ } \mu\text{g/ml}$  LipA und somit  $5400 \text{ nmol/ml}$  LipA (berechnet mit  $37000 \text{ g/mol}$ ) eingesetzt (0).

Diese Rechnung lässt darauf schließen, dass bei der funktionellen Analyse der oberflächenexponierten Lipase (siehe 4.1.2.2) nur ein Zehnmillionstel der LipA Menge verwendet wurde, welches für den löslichen Enzymtest verwendet wurde. Aus diesem Grund muss auch ein schwächerer Umsatz des Substrates angenommen werden. Der Substratumsatz ist nach der Berechnung unterhalb der Nachweisgrenze für den Enzymtest mit p-Nitrophenolcabrylat. Im Weiteren wurden für den Enzym mit der

oberflächenexponierten Lipase ganz Zellansätze verwendet. Hier ist das Hintergrundrauschen und somit die Detektionsgrenze durch die im Ansatz enthalten *E. coli*-Zellen höher, da *E. coli* eigener Lipasen ebenfalls das Substrat umsetzen können. Aus diesem Grund wurde eine Untersuchung mittels ESCAPED-Verfahren durchgeführt, da diese auf Grund des Anfärbens einzelner Zellen ein sensitiveres Signal geben sollte.

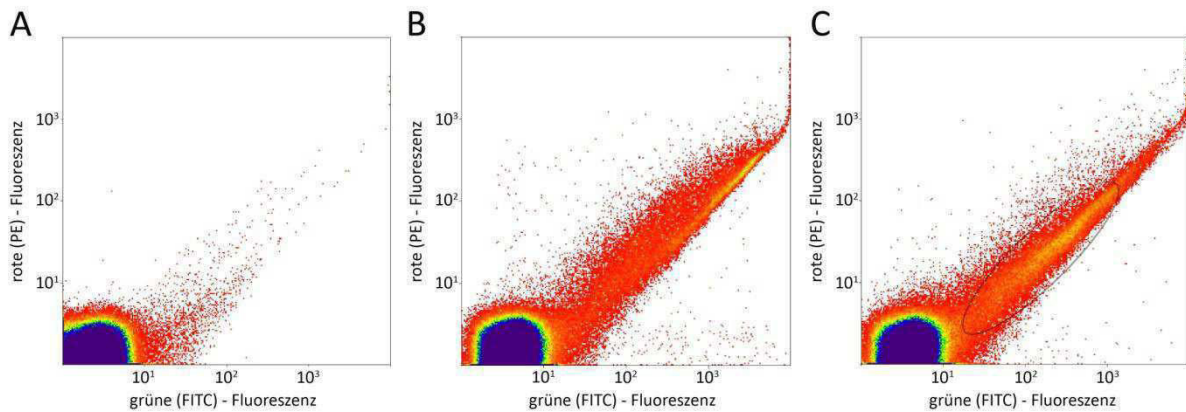
#### **4.1.2.3.3 Untersuchung der Aktivität von oberflächenpräsentiertem LipA mittels ESCAPED-Verfahren**

Unter der Annahme, dass die Lipase möglicherweise aktiv auf der Oberfläche einiger weniger Zellen vorliegt, wurde eine Aktivitätsfärbung (ESCAPED) im FACS durchgeführt. Wenn dies der Fall ist, wurde erwartet, dass ein Teil der Zellen nach der Zugabe von LipH eine gefärbte Population im FACS-Histogramm zeigt.

Hierzu wurden LipA-präsentierende Zellen mit und ohne LipH für 30 min vorinkubiert. Dabei wurde neben *E. coli* BL21 (DE3) auch der *E. coli* Stamm JK321 verwendet, welcher auch von Yang *et al.* zur Präsentation der Lipase verwendet wurde. Beide *E. coli* Stämme zeigten vergleichbare Fluoreszenzhistogramme. Daher wurde mit dem *E. coli* Stamm JK321 weiter gearbeitet, da für diesen eine erfolgreiche aktive Präsentation der Lipase auf *E. coli* Zellen in der Literatur beschrieben wurde (Yang *et al.* 2010).

Im Folgenden wurden verschiedene Zeiten für die Inkubation mit dem Substrat R/S-Methyldekansäureester verwendet (5, 10, 20 und 60 Minuten), um die beste Inkubationszeit zu ermitteln. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die präsentierenden Zellen gut gefärbt waren, sich die Reaktion nicht in der Sättigung befand, möglichst geringe unspezifischen Markierungen durch Spontanhydrolyse vorhanden waren und die Markierung möglichst schonend für die Zellen durchgeführt wurde. Bei diesen Versuchen zeigten alle Zeitpunkte eine hohe unspezifische Markierung der LipA-präsentierender Zellen im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen (*E. coli* JK321 bzw. JK321 pEst100-LipH). Abbildung 21 zeigt exemplarisch die Färbung einer Aktivitätsfärbung für 20 Minuten. Im Vergleich zu den Negativ-Kontrollen (A) zeigt die Färbung von LipA-präsentierenden Zellen ein hohes Hintergrundsignal ohne Zugabe der Foldase (B). Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine

unspezifische Färbung durch *E. coli* eigene lipolytische Enzyme bzw. durch Spontanhydrolyse. LipA-präsentierende Zellen, welche vor der Färbung mit der Foldase LipH inkubiert wurden, zeigen ebenfalls dieses starke Hintergrundsignal. Im Vergleich zu den JK321 pEst100-LipA Zellen ist jedoch eine kleine Population stärker gefärbter Zellen innerhalb dieses Signals auszumachen (siehe schwarze Umrahmung in Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Zwei-Farben Markierungen von LipA präsentierenden *E. coli* Zellen mit und ohne Zugabe der Foldase LipH

Die FACS-Histogramme zeigen die oberflächengekoppelte Aktivitätsfärbung mit den Enantiomeren R-Methyldekansäureester und S-Methyldekansäure. Das S-Enantiomer wurde mit Phycoerythrin (PE, rot) und das R-Enantiomer mit FITC (grün) angefärbt. A) Negativ-Kontrolle JK321. B) JK321 pEst100-LipA ohne LipH Zugabe und C) JK321 pEst100-LipA mit LipH Zugabe.

Die Aktivitätsbestimmung mittels FACS-Färbung zeigte, dass die Lipase A aktiv auf *E. coli* Zellen präsentiert werden kann. Hierbei präsentiert lediglich eine Subpopulation, welche sich kaum vom Hintergrundsignal abhebt, die durch LipH aktive Lipase.

Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass das ESCAPED-System auf *E. coli* nicht für die Optimierung der Lipase A bezüglich ihrer Enantioselektivität geeignet ist, da ein starkes Hintergrundsignal besteht, welches bei einer Selektion möglicher Varianten stört.

#### 4.1.2.3.4 Exkurs: Selektion eines spezifischen cameloiden Antikörpers gegen die Foldase

Für den Nachweis der Foldase wurde ein spezifischer cameloider Antikörper (VHH-Antikörper) mittels Phage-Display selektiert. Da die polyklonalen Kaninchenserum für die Detektion von LipA und LipH in begrenzten Mengen vorlagen, wurde die Selektion von VHH-Antikörpern angestrebt. Die Selektion eines Antikörpers gegen die Lipase konnte nicht erfolgen, da diese nur in geringen Mengen ohne die Foldase löslich war. Für die Selektion wurde die, wie unter 0 beschrieben, gereinigte Foldase biotinyliert (3.3.5.2). An ein LipH Molekül wurden hierbei ca. 1,4 Biotinmoleküle konjugiert. Es wurden insgesamt zwei Selektionsrunden durchgeführt. In den einzelnen Runden wurden  $10^{11}$  Phagen eingesetzt. Nach der ersten Runde betrug die Phagenkonzentration  $8 \cdot 10^3$ . In der zweiten Runde konnte eine deutliche Anreicherung erkannt werden. Die Phagenkonzentration betrug nach der zweiten Selektionsrunde ca.  $1 \cdot 10^7$ . Zehn Einzelklone wurden zunächst über ELISA-Analyse auf ihre Bindung untersucht (Abbildung 22) und nach Bestätigung der selektiven Bindung an LipH sequenziert.

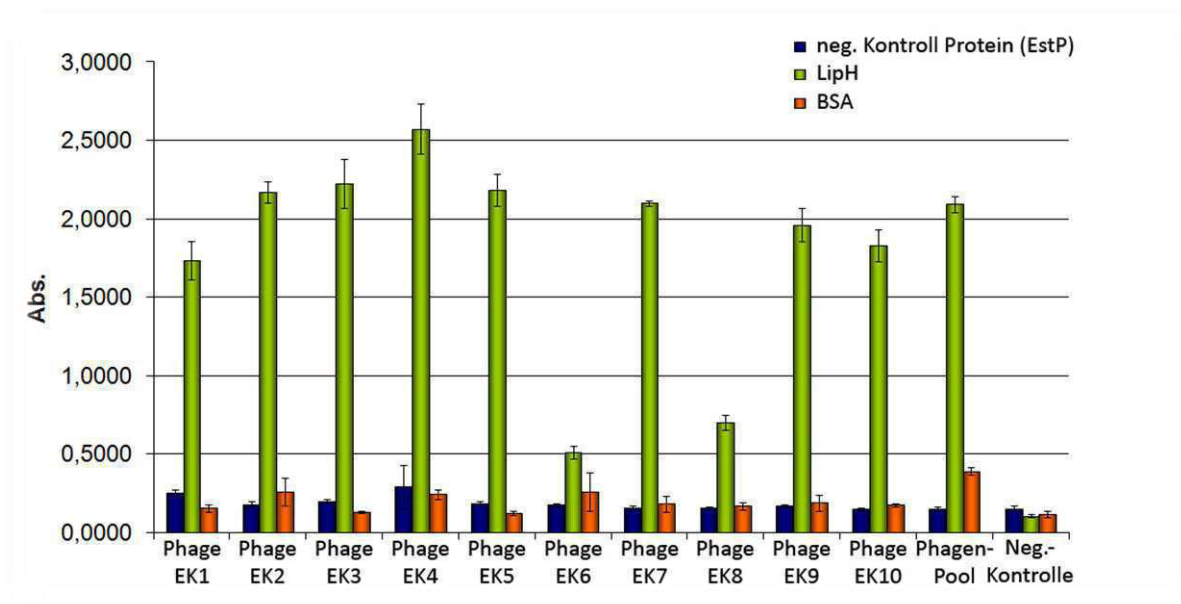


Abbildung 22: Phage-ELISA-Analyse von zehn potentiellen LipH Bindern

In Blau und Orange sind die Negativ-Kontrollen dargestellt. Neben BSA wurde die ELISA-Platte mit einem Referenzprotein beschichtet (Blau). Neben den einzelnen Phagen wurde der Phagen-Pool vor der ersten Runde sowie der Helferphage als Negativ-Kontrolle vermessen. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt. Die daraus resultierenden Standardabweichungen sind gezeigt.

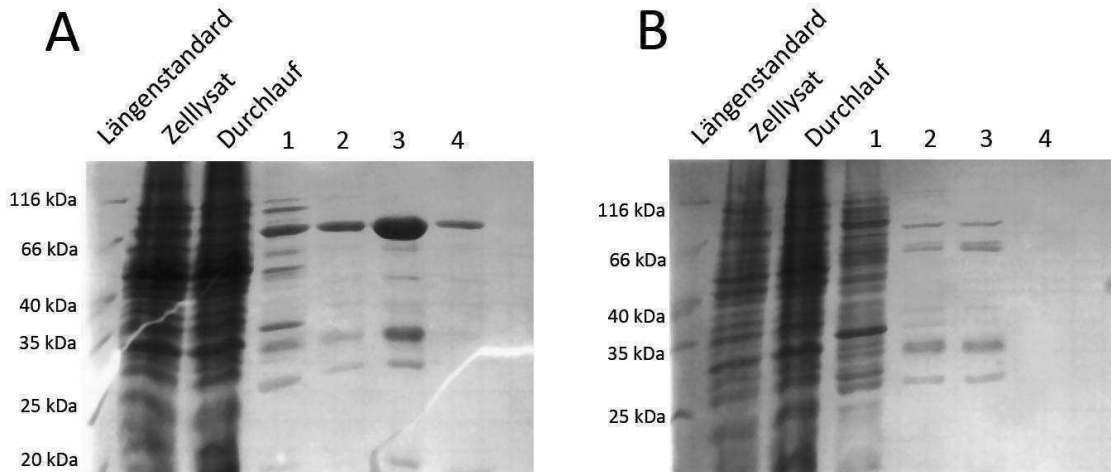
Die Sequenzierung der Einzelklone zeigt, dass sich hauptsächlich zwei Binder angereichert haben. Im Vergleich dieser beiden Binder zeigt sich in der CDR2 das gleiche Motiv (SLA). Alle Sequenzen weisen Amber-Stopcodons in der Sequenz auf. Dies beruht auf der synthetisch hergestellten VHH-Bibliothek, da diese statistisch vermehrt Amber-Stopcodons aufweist (Abbildung 23).

			CDR1		CDR2		CDR3	
VHH_LipH_EK3	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTYS	SGGAGWFRQA	PGKEREIVAF	I* <b>TSLAF</b> -TY (...)	CAAP	AQLYP <b>AE</b> PKV -FDYWGQGTQ
VHH_LipH_EK5	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTYS	SGGAGWFRQA	PGKEREIVAF	I* <b>TSLAF</b> -TY (...)	CAAP	AQLYP <b>AE</b> PKV -FDYWGQGTQ
VHH_LipH_EK7	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTYS	SGGAGWFRQA	PGKEREIVAF	I* <b>TSLAF</b> -TY (...)	CAAP	AQLYP <b>AE</b> PKV -FDYWGQGTQ
VHH_LipH_EK10	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTYS	SGGAGWFRQA	PGKEREIVAF	I* <b>TSLAF</b> -TY (...)	CAAP	AQLYP <b>AE</b> PKV -FDYWGQGTQ
VHH_LipH_EK8	EVQLVESGGG	SVQAGGSLRL	SCTASGFTYS	LLSPLWFRQA	PGKEREGVAF	ISLARE*-TY (...)	CAAE	LMVTPDRRWL -FDYWGQGTQ
VHH_LipH_EK9	EVQLVESGGG	SVQAGGSLRL	SCTASGFTYS	LLSPLWFRQA	PGKEREGVAF	ISLARE*-TY (...)	CAAE	LMVTPDRRWL -FDYWGQGTQ
VHH_LipH_EK1	EVQLVESGGG	SVQAGGSLRL	SCTASGFTFS	RHLTRWFRQA	PGKEREGVAI	I <b>AWW</b> *PW-TY (...)	CAAN	PFQRTNTFTK -FDYWGQGTQ
VHH_LipH_EK2	EVQLVESGGG	LVQAGGSLRL	SCTASGFTFS	RAPPWWFRQA	PGKEREIVAF	IGGGLLW-TY (...)	CAAG	PMSTRPL--- -FDYWGQGTQ
VHH_LipH_EK4	EVQLVESGGG	SVQAGGSLRL	SCTASGYTFS	QAASHWFRQA	PGKEREIVAF	IGREGGL-TY (...)	CAAW	G* <b>AHTTP</b> WRS TFDYWGQGTQ
VHH_LipH_EK6	EVQLVESGGG	LGAAGRQFAP	ELRRERLYL*	LSASGVVSPG	AGQRTNCVA	D* <b>LRGAV</b> STY (...)	CAAC	IQSRRLD--- -FDYWGQGTQ
Sequenz nach Design (Diplomarbeit G.H.)	EVQLVESGGG	SVQAGGSLRL	SCTASGYTYS	XXXXXWFRQA	PGKEREGVAX	IXXXXXXXTY (...)	CAAX	XXXXXXXXXX XFDYWGQGTQ
		L P	A F F		I S			

Abbildung 23: Sequenzen der über Phage-Display selektierten LipH-bindenden VHH-Antikörper

Für die lösliche Expression und weitere Analysen wurden die Einzelklone 3 und 8 aus dem Phagmid in den Expressionsvektor pTET über SfiI-Schnittstellen umklontiert. Dieser Expressionsvektor ermöglicht, den cameloiden Antikörper als Fusionsprotein mit der alkalischen Phosphatase sowie mit einem His-Tag zu exprimieren. Die Expression erfolgte in JM109(DE3) pEZ-tet-SupE (*low copy* Plasmid für t-RNA Amber-Codon) Zellen. Im Anschluss wurden die Fusionsproteine über IMAC gereinigt und die Reinigung über SDS-PAGE analysiert (Abbildung 24). Die Ausbeute der Proteine nach Reinigung waren für EK3 5 mg/l und für EK8 2 mg/l. Im Folgenden werden die beiden Proteine als VHH-LipH3AP und als VHH-LipH8AP bezeichnet. Beide Antikörper wurden auf ihre Bindung untersucht. Da beide Antikörper nahezu die gleichen Messergebnisse ergaben, werden im Folgenden nur die Rohdaten zu VHH-LipH8AP gezeigt.

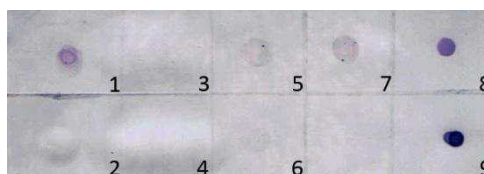




**Abbildung 24:** SDS-PAGE nach Überexpression von VHH-LipH3AP (A) und VHH-LipH8AP (B) in *E. coli* JM109(DE3) pEZ-tet-SupE

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das Trenngel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. A u. B) Reinigung von VHH-LipH3AP (A) und VHH-LipH8AP (B) durch eine immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC): Längenstandard; Zellysat nach erfolgter Überexpression; Durchlauf; 1-4 Elutionsfraktionen mit steigender Imidazolkonzentration (40 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM Imidazol).

Zur näheren Charakterisierung wurde mit den beiden Antikörpern ein Dot Blot durchgeführt. Hierzu wurden das gefaltete, native LipH, denaturiertes mit Harnstoff behandeltes LipH, mit DTT behandeltes, aufgekochtes LipH sowie mit LipA vorinkubiertes LipH auf die Membran aufgetropft. Für beide Binder zeigt sich, dass es sich um Strukturbinder handelt. Nach der Zerstörung der Tertiärstruktur wurde kein Signal im Dot Blot erhalten. Das Binden an LipA scheint die Bindung der cameloiden Antikörper nicht zu beeinflussen (Abbildung 25).



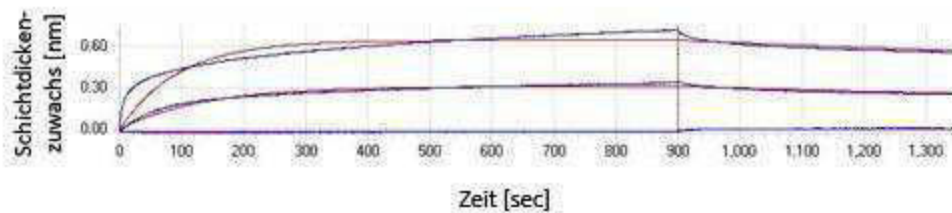
**Abbildung 25:** Dot Blot-Analyse der Bindung von VHH-LipH8AP an LipH

Auf die Membran aufgetropft wurden 1) 3 µg LipH, 2) 5 µg LipA, 3) 3 µg LipH in 2,5 M Harnstoff, 4) 3 µg LipH in 4 M Harnstoff, 5) 3 µg LipH mit 500 µM DTT, 6) 3 µg LipH 5 min gekocht, 7) 5 µg LipA mit 3 µg LipH 30 min vorinkubiert, 8) AntiMausAP 0,1 µg, 9) VHH-LipH8AP 1 µg. Für die Detektion wurden 10 µg VHH-LipH8AP verwendet.

Die Bindungskinetik wurde für beide Antikörper mittels *Bio-Layer Interferometry* (BLI) bestimmt. Hierzu wurde das biotinylierte LipH an Streptavidin-*Tips* immobilisiert. Die gereinigten LipH-VHH AP-Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und die Bindung an das immobilisierte LipH gemessen. Die Sensogramme sowie die Berechnung wurden mit Hilfe der Software ForteBio Data Acquisition 6.3 aus den primären Sensogrammen der Kontrollmessung und der mit LipH beschichteten Streptavidin-*Tips* vorgenommen.

**Tabelle 10: Kinetik und Affinität der VHH-Antikörper gegen LipH mittels SPR-Analyse**

	Kd [nM]	Assoziation $K_{on}$ ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	Dissoziation $k_{dis}$ ( $s^{-1}$ )
VHH-LipH3AP	10	$2,45 \cdot 10^5$	$1,34 \cdot 10^3$
VHH-LipH8AP	7,92	$4,97 \cdot 10^4$	$2,81 \cdot 10^4$



**Abbildung 26: Sensogramm der Bindung zwischen VHH-LipH8 und LipH**

Die Kurven zeigen die Messungen mit 90  $\mu M$ , 18  $\mu M$  und 3,6  $\mu M$  VHH-LipH8 nach Abzug der Referenz. In Rot ist die vom Programm für die Bestimmung der Bindekonstante ermittelte Bindekurve dargestellt. Für die Bestimmung wurde die mittlere Kurve (18  $\mu M$  VHH-LipH8) verwendet, da hier die Übereinstimmung der gemessenen Kurve und der Berechnung am größten ist.

#### **4.1.3      Oberflächendisplay der Cutinase aus *F. solani pisi* auf der Oberfläche von *E. coli***

Die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* gehört zu den erfolgreich durch die Esterase A präsentierten Enzymen (Becker *et al.* 2007). Durch die schon vorhandene funktionelle Präsentation auf *E. coli* bietet sich diese sogenannte Minimal-Hydrolase an, um das schon für EstA erfolgreiche Selektionsverfahren für enantioselektive Enzymvarianten auf ein Passagierenzym zu erweitern. Dieser Abschnitt untergliedert sich in die Untersuchung der Überlebensrate und der Optimierung des ESCAPED-Verfahrens, in die Erstellung einer CAST-Bibliothek und die Suche nach einer enantioselektiven Variante mittels ESCAPED-Verfahren.

##### **4.1.3.1      Untersuchung der Überlebensrate und deren Optimierung nach Zellsortierung**

In ersten Sortierungen wurde das ESCAPED-Verfahren für Cutinase-präsentierende Zellen näher untersucht. Hierzu wurde der Einfluss des ESCAPED-Verfahrens auf die Cutinase-präsentierenden Zellen untersucht.

Für die Färbung der Zellen wurde zunächst die Reaktionszeit für die Aktivitätsfärbung mit den beiden Methyldekansäureestern ermittelt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die präsentierenden Zellen gut gefärbt waren, sich die Reaktion nicht in der Sättigung befand, eine geringe unspezifische Markierung durch Spontanhydrolyse vorhanden war und die Markierung möglichst schonend für die Zellen durchgeführt wurde. Die gewünschte Färbung zeigte sich nach 20 Minuten Reaktionszeit. Diese Zeit wurde für alle Messungen beibehalten.

Für die Zellen wurde die Überlebensrate nach Aktivitätsfärbung und Sortierung betrachtet. Hierzu wurde eine feste Anzahl (144 Klone je Platte) mit Biotintyramid gefärbter wildtyp Zellen auf LB- sowie auf M9-Festmedien unter Verwendung des CyClone-Einzelablagearms aussortiert. Dabei stellte sich heraus, dass lediglich 10 % der Zellen nach der Sortierung anwuchsen. Zwischen den verschiedenen Medien zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Im Folgenden wurden diese Zellen auf Tributyrinplatten überimpft, um diese auf ihre Aktivität zu prüfen. Hier zeigte sich, dass lediglich 6 % der Zellen Aktivität besaßen.

Da dies eine schlechte Ausgangsbedingung für die Sortierung von Bibliotheken und die Findung aktiver Einzelklone darstellt, wurde das Verfahren erweitert. Um nach der Sortierung nicht >99 % der aktiven Zellen zu verlieren, wurden die Zellen nach der Sortierung nicht angezogen sondern das Cutinase-Gen der aussortierten Zellen mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden die aussortierten Zellen direkt in zehnfachen Tag-Puffer sortiert. Um den Aufschluss der Zellen zu verbessern wurde dieser Ansatz bei -20 °C über Nacht eingefroren. Das in den Zellen enthaltenen Cutinase-Gene wurde mittels PCR hochamplifiziert und in Sucrose-gereinigten pEst100-Vektor ligiert. Nach der Transformation wurden die Zellen auf LB-Festmedium angezogen und geerntet. Um die Anzahl aktiver Zellen zu bestimmen, wurden 100 Einzelklone auf Tributyrinplatten überimpft. Hier zeigte sich, dass durch diesen Zwischenschritt 85 % aktive Klone erhalten werden.

#### **4.1.3.2 CASTing und erstellen der CAST-Bibliothek**

Nachdem am Wildtyp gezeigt wurde, dass eine erfolgreiche Sortierung aktiver Klone möglich ist, wurden zur enantioselektiven Optimierung der Cutinase Enzymvarianten hergestellt. Um die Anzahl der Varianten zunächst einzuschränken, wurden CAST-Bibliotheken erzeugt, bei denen nur die Aminosäuren randomisiert wurden, welche an der Bindung des Substrats beteiligt sind. Die Cutinase bietet sich für ein CASTing (1.2.2.1) an, da eine Vielzahl an Kristallstrukturen bekannt ist. Neben dem wildtyp Enzym sind verschiedenste Mutanten des Enzyms sowie verschiedenste Substrate in der Bindetasche kristallisiert.

Das CASTing wurde von Herrn Dr. Marco Bocola (Institut für Biophysik und physikalische Biochemie; Universität Regensburg) durchgeführt. Für die Auswahl der Aminosäuren wurden die gewünschten Enantiomere in die Substratbindetasche der Kristallstruktur (1AGY Auflösung: 1,1 Å) modelliert. Für die Biotintyramid-2-Methyldekansäureester ergaben sich die in Tabelle 11 aufgelisteten Positionen für die jeweiligen Unterbibliotheken. Betrachtet man die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren, so bilden die Positionen der Unterbibliotheken A und C die Tasche für die Bindung der alkoholischen Biotin-Komponente des Esters. Die Unterbibliotheken B, D und E bilden hingegen die Tasche für die Bindung der Säure.

Tabelle 11: Unterbibliotheken für das CASTing der Cutinase

Unterbibliothek	Randomisierende Aminosäuren	Bindung
A	Ser42, Glu44, Thr50	alkoholischer Biotin-Rest
B	Leu81, Asn84	Säure-Rest
C	Tyr119, Gln121	alkoholischer Biotin-Rest
D	Thr150	Säure-Rest
E	Val177, Leu182, Val184	Säure-Rest

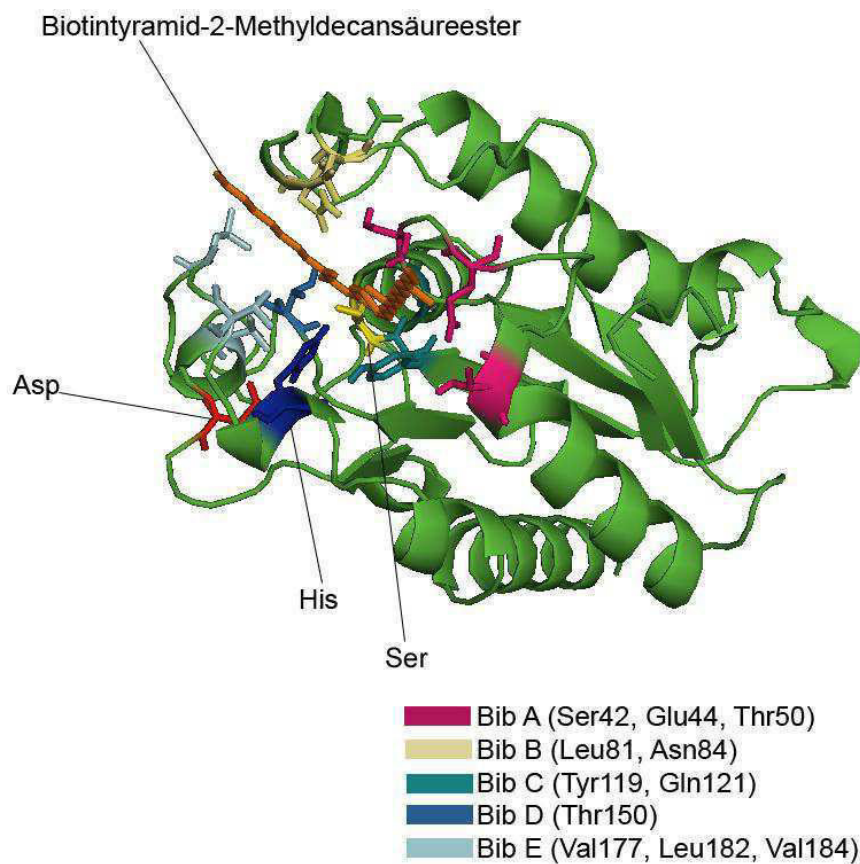


Abbildung 27: Kristallstruktur der Cutinase aus *Fusarium solani pisi*

Die Cutinase (grün) ist mit Methyldecansäureester im aktiven Zentrum (orange) dargestellt. Das aktive Zentrum (Serin (Ser) gelb; Aspartat (Asp) rot und Histidin (His) dunkelblau) und die randomisierten Positionen der einzelnen CAST-Bibliotheken sind farblich hinterlegt.

Um die Anzahl der möglichen Varianten pro Unterbibliothek weiter einzuschränken, wurde für die Randomisierung das NNK Codon für jede Aminosäure verwendet. Da die höchste Anzahl an Aminosäureaustauschen drei beträgt und somit die mögliche maximale Anzahl der erhaltenen Varianten statistisch 8000 beträgt, werden 24000 Transformanten für diese Bibliotheken benötigt (Reetz *et al.* 2005). Die Mutationen wurden über SOE-PCR eingeführt. Neben den Mutationen für die einzelnen Bibliotheken wurden in die Primer über stille Mutationen Restriktionsschnittstellen inseriert oder deletiert, um den Erfolg der PCR und die Klonierung überprüfen zu können. Lediglich die Oligonukleotide für Bibliothek B enthalten keine Schnittstelle zur Überprüfung. Die PCR-Produkte wurden in den gereinigten pEst-100 Vektor ligiert und in JK321 Zellen transformiert (siehe hierzu auch Tabelle 6 Oligonukleotid-Sequenzen und Anhang Sequenzen Cutinase CAST-Bibliotheken).

#### **4.1.3.2.1 Charakterisierung der einzelnen Unterbibliotheken**

Zur Charakterisierung der einzelnen Unterbibliotheken wurde zunächst die tatsächliche Anzahl an Varianten pro Bibliothek bestimmt. Hierzu wurde die Anzahl der Gesamt-Transformanten mit der Anzahl an Klonen verrechnet, welche ein Cutinase-Insert enthielten. Die Anzahl der Gesamt-Transformanten wurde über Verdünnungsplattierungen bestimmt. Für die Quantifizierung der Cutinase-Inserts wurde eine Kolonie-PCR mit Einzelklonen durchgeführt. Für die Bibliotheken A, C, D und E enthielten 3/5 der Klone ein richtiges Insert. Bei der Bibliothek B enthielten lediglich 50 % ein richtiges Insert. Von je fünf Einzelklonen einer Bibliothek wurden Plasmide isoliert und diese mit Sfi restringiert. Die so ermittelte Bibliotheksgröße ist in Tabelle 12 angegeben. Bei den Bibliotheken A, C, D und E wurden zusätzlich Restriktionsanalysen von fünf Einzelklonen durchgeführt, um den Erfolg der SOE-PCR zu überprüfen und eine mögliche Verunreinigung durch das wildtyp Cutinase-Gen auszuschließen.

Zur Abschätzung, wie viele Einzelklone pro Bibliothek nach Einführen der Mutationen noch Aktivität besitzen, wurden fünfzig Einzelklone je Unterbibliothek auf Tributyrinplatten überführt und die aktiven Klone anhand der Abbauhöfe bestimmt (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Charakterisierung der Einzelbibliotheken**

Unterbibliothek (Mutationen)	Bibliotheksgroße	Aktivität auf Tributyrinplatten
A (Ser42, Glu44, Thr50)	$4 \cdot 10^4$	9 %
B (Leu81, Asn84)	$1,5 \cdot 10^7$	7 %
C (Tyr119, Gln121)	$5,7 \cdot 10^4$	6 %
D (Thr150)	$9,5 \cdot 10^4$	4 %
E (Val177, Leu182, Val184)	$8 \cdot 10^4$	4 %

Bei der Erstellung der Einzelbibliotheken konnten zunächst nur die Bibliotheken A, C, D und E erhalten werden. Die Bibliothek B wurde separat von den anderen Bibliotheken erstellt und charakterisiert. Für diese Bibliothek mussten zur Überprüfung, ob die Mutationen mittels SOE-PCR eingeführt wurden, Einzelklone sequenziert werden. Von allen Unterbibliotheken wurden je drei Einzelklone, welche ein positives Restriktionsmuster gezeigt hatten, sequenziert (Abbildung 28 A und B). Die Sequenzierungen zeigten, dass sich an den gewünschten Positionen Aminosäureaustausche befanden (Abbildung 29). Für die Unterbibliothek E konnten keine auswertbaren Sequenzen erhalten werden. Da hier die Testrestriktionen den Nachweis für eine erfolgreiche Klonierung erbracht hatten, wurde auf eine erneute Sequenzierung verzichtet (siehe Abbildung 28 C). Die sequenzierten Einzelklone bzw. Einzelklone mit richtigem Restriktionsmuster bzw. positiver Kolonie-PCR wurden auf ihre Aktivität mittels Tributyrinplatten überprüft. Keiner der Einzelklone zeigte hier Aktivität.

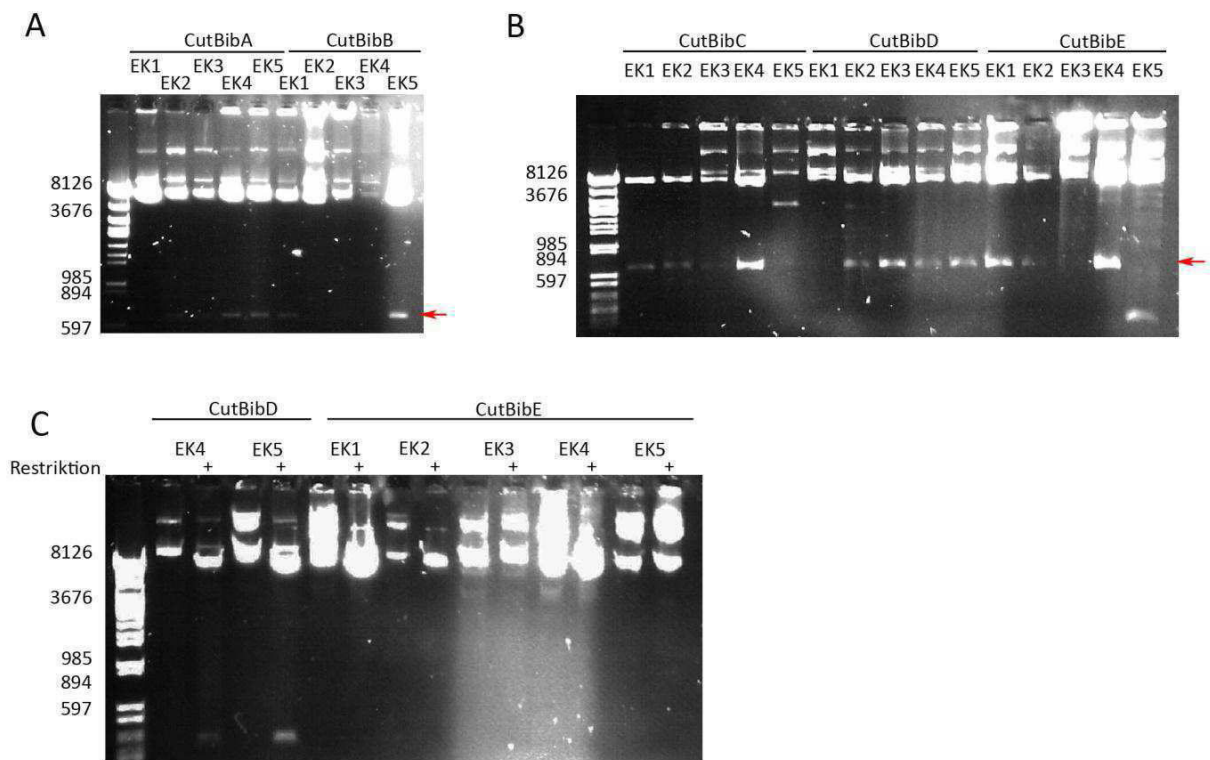


Abbildung 28: Restriktionsanalysen der Cutinase CAST-Bibliotheken  
A-B) Testrestriktion je fünf Einzelklone (EK) der Unterbibliotheken A-E mit SfiI zur Bestimmung der tatsächlichen Bibliotheksgröße. Die beiden im pEst100-Cut enthaltenen SfiI-Schnittstellen flankieren das Cutinase-Gen mit 660 bp (roter Pfeil). C) Testrestriktion von fünf Einzelklonen der Unterbibliothek E mit der unigenen Restriktionsschnittstelle Agel, welche über den CAST-Primer eingeführt wurde, wodurch es bei einem Bibliotheksklon im Restriktionsmuster zur Linearisierung des Vektors kommt. Dies trifft für die Einzelklone 1, 2 und 4 zu. Die beiden Einzelklone 3 und 5 zeigen in der SfiI-Restriktion (B) ebenfalls kein positives Signal. Somit enthalten sie auch nicht das wildtyp Enzym. Weiter auf dem Gel (C) die Einzelklone 4 und 5 der Unterbibliothek D, welche über den CAST-Primer eine dritte PstI-Restriktionsschnittstelle im Cutinase-Gen (Restriktionsmuster Cutinase wt: 6086 bp, 1869 bp; Cutinase BibD: 5747 bp, 1869 bp, 339 bp) enthalten, wenn es sich um einen Bibliotheksklon handelt.

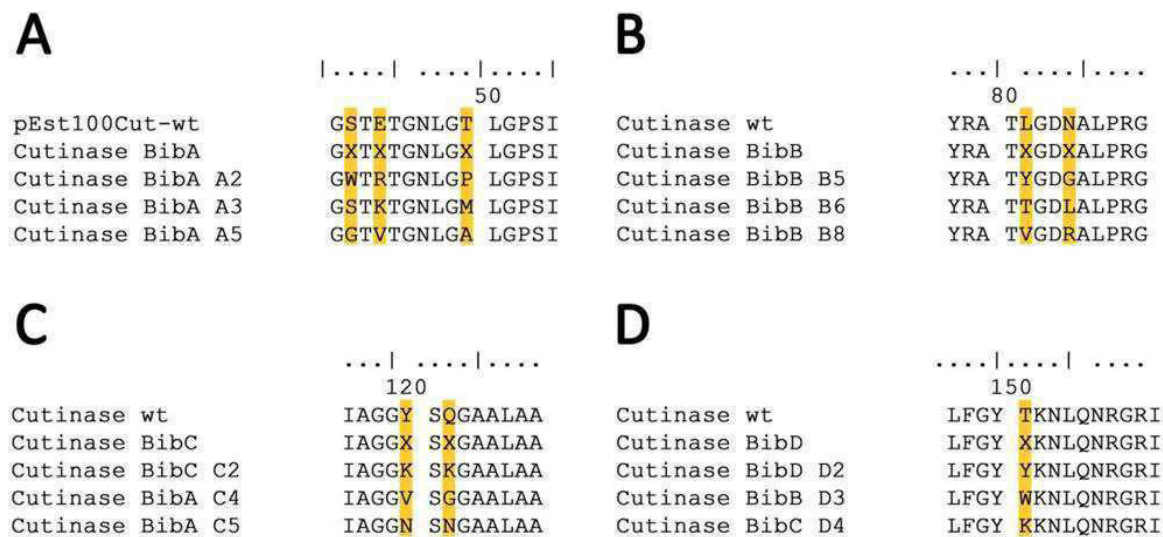
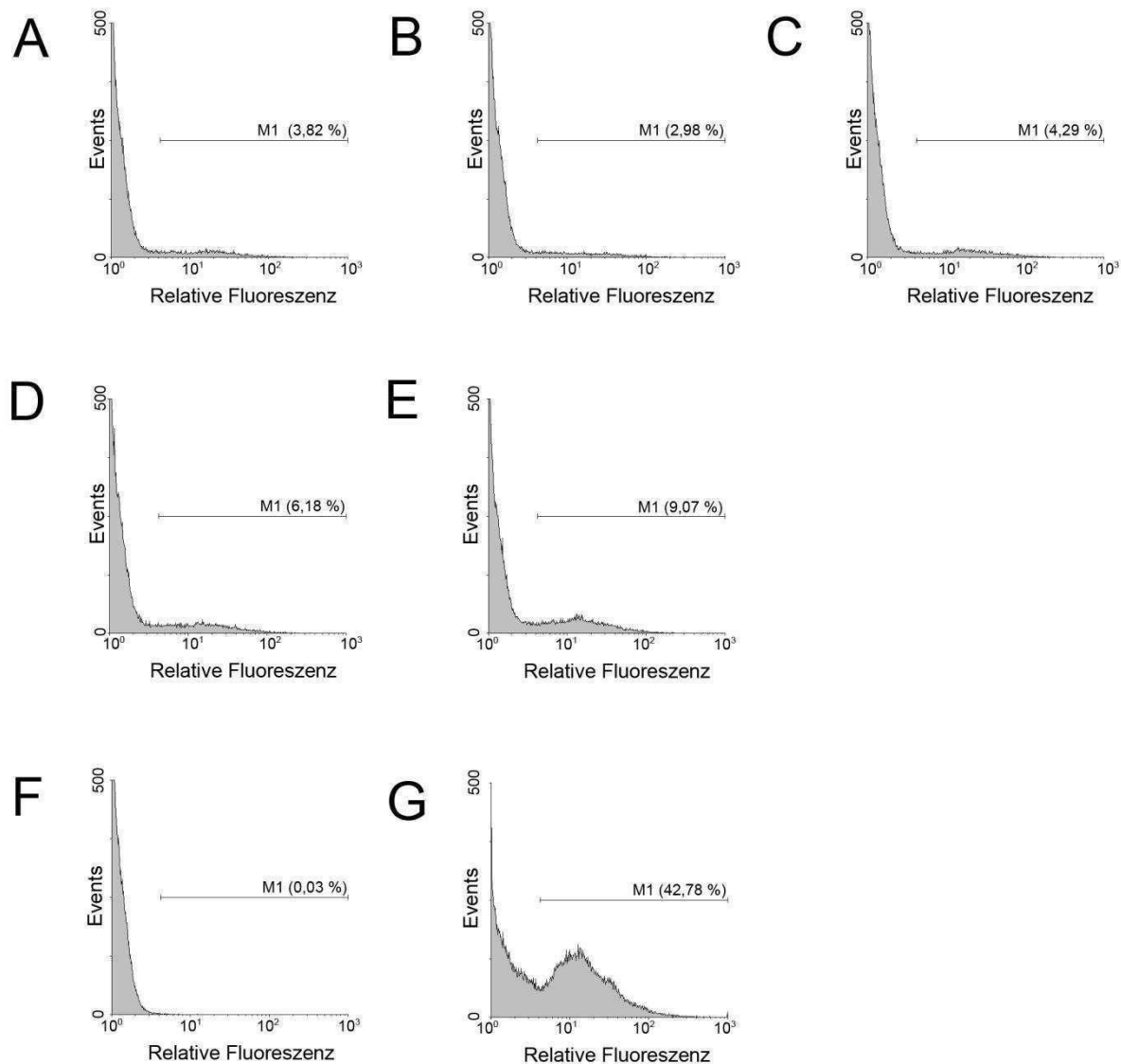


Abbildung 29: Sequenzen für je drei Einzelklone der einzelnen Unterbibliotheken A,B,C und D



#### 4.1.3.2.2 FACS-Analysen der einzelnen Bibliotheken

Die einzelnen Bibliotheken wurden angezogen und induziert (3.4.1). Die Unterbibliotheken, der Wildtyp sowie die Negativ-Kontrolle wurden zunächst auf Expression des Fusionsproteins mittels E-Tag Färbung untersucht (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Untersuchung der Expression der Cutinase Bibliotheken mittels FACS-Analyse**

Die FACS-Histogramme zeigen die Immunfärbung (Etag-Antikörper) der einzelnen Unterbibliotheken A) JK321 pEst100-Cut BibA, B) JK321 pEst100-Cut BibB, C) JK321 pEst100-Cut BibC, D) JK321 pEst100-Cut BibD, E) JK321 pEst100-Cut BibE, F) JK321 (Negativ-Kontrolle), G) JK321 pEst100-Cut (Positiv-Kontrolle)

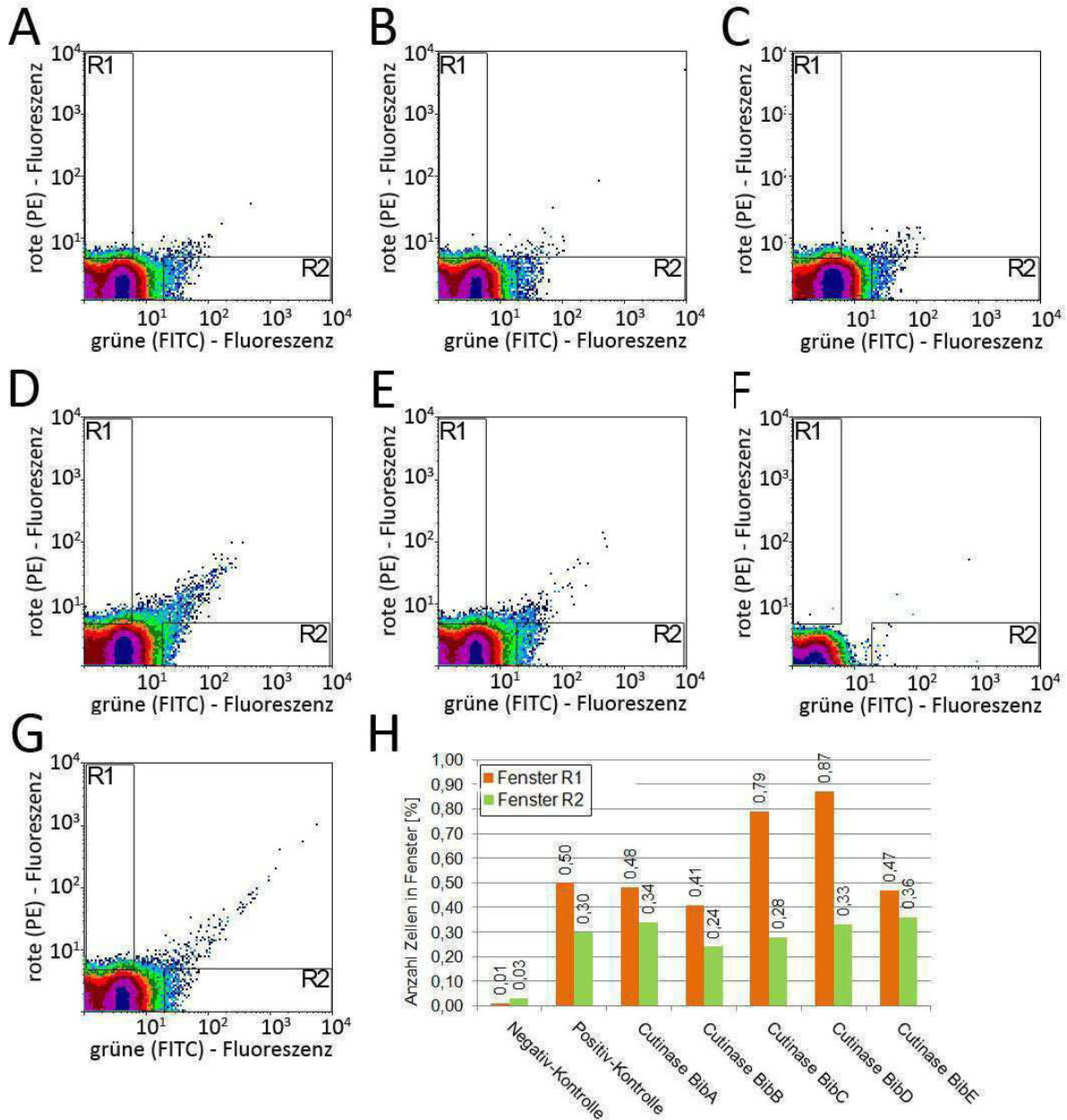
Alle Einzelbibliotheken zeigen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle ein positives Fluoreszenzsignal. Dieses ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp (JK321 pEst100-Cut) geringer. Zur Auswertung wurde ein Fenster in das Histogramm gelegt und der Prozentsatz der Zellen ermittelt, welcher ein positives Fluoreszenzsignal und somit oberflächenexponiertes Fusionsprotein anzeigt (siehe Abbildung 30 M1).

In diesem Fenster (M1) wurden für den Wildtyp (JK321 pEst100-Cut) 42,78 % der gefärbten Zellen detektiert. Bei den einzelnen Bibliotheken wurden 3-9 % der Zellen gefärbt. Tabelle 13 gibt eine Zusammenfassung der im Fenster M1 (Abbildung 30) detektierten Zellen.

**Tabelle 13: Expressionsuntersuchung der Einzelbibliotheken mittels Fluoreszenzfärbung E-tag siehe auch (Abbildung 30)**

	Prozentsatz der fluoreszierenden Zellen im Fenster M1
JK321 pEst100-Cut	42,78 %,
JK321 (Negativ-Kontrolle)	0,03 %
pEst100-Cut BibA	3,82 %
pEst100-Cut BibB	2,98 %
pEst100-Cut BibC	4,29 %
pEst100-Cut BibD	6,18 %
pEst100-Cut BibE	9,07 %

Im Folgenden wurden die fünf Bibliotheken bezüglich ihrer lipolytischen Aktivität untersucht. Hierzu wurden die induzierten Zellen mit (R/S)-Methyldekansäureester-Tyramid-Konjugat gefärbt, Fluoreszenzgefärbt und im FACS analysiert (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Untersuchung der lipolytischen Aktivität der Cutinase Bibliotheken**

Die FACS-Histogramme (A-G) zeigen die oberflächengekoppelte Aktivitätsfärbung mit den Enantiomeren R-Methyldekansäureester und S-Methyldekansäure. Das S-Enantiomer wurde mit Phycoerythrin (PE, rot) und das R-Enantiomer mit FITC (grün) angefärbt. Die zur Analyse eingefügten Regionen repräsentieren die für die jeweilige Markierung spezifischen Fluoreszenzemissionsbereiche, welche im Folgenden zur Sortierung der Bibliotheken verwendet wurden. A) JK321 pEst100-Cut BibA, B) JK321 pEst100-Cut BibB, C) JK321 pEst100-Cut BibC, D) JK321 pEst100-Cut BibD, E) JK321 pEst100-Cut BibE, F) Negative-Kontrolle JK321, G) Positiv-Kontrolle JK321 pEst100-Cut (wildtyp Enzym) H) Zusammenfassung der Ergebnisse in Form der prozentualen Anteile der Gesamtresultate in den entsprechenden Regionen.

Alle fünf Unterbibliotheken zeigen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle eine Fluoreszenzfärbung, welche durch eine Verschiebung der Hauptpopulation zu erkennen ist. In den jeweiligen Markierungen der spezifischen Fluoreszenz-emissionsbereiche zeigen sich bei den Unterbibliotheken Unterschiede, welche für das Vorhandensein von Einzelklonen mit veränderter Enantioselektivität sprechen. Insbesondere die Unterbibliotheken C und D zeigen einen größeren Anteil an Zellen im spezifischen Fluoreszenzemissionsbereiche (rotes Fluoreszenzsignal) des S-Enantiomers.

#### **4.1.3.2.3 Durchmusterung der Bibliotheken**

Für die Durchmusterung der Bibliotheken wurden die einzelnen Unterbibliotheken separat angezogen und induziert (3.4.1). Nach der Induktion der Zellen wurden die OD600nm bestimmt und die Bibliotheken im gleichen Verhältnis gemischt. Die Färbung wurde wie unter 3.4.4.1 beschrieben durchgeführt. Die Regionen für die Selektion wurden so gewählt, dass möglichst keine Zellen/Events aus der Negativ-Kontrolle und der Positiv-Kontrolle (wildtyp) sich in dieser Region befanden. Es wurden zwei Regionen ausgewählt, wobei eine Region im grünen Fluoreszenzbereich und eine Region im roten Fluoreszenzbereich gewählt wurde. Hierbei sollten sich in der grünen Region präsentierende Zellen befinden, welche präferent das R-Enantiomer umsetzten und in der roten Region Zellen, welche präferent das S-Enantiomer umsetzten.

Beide Regionen wurden ähnlich mit Sortierungsfenstern der Einzelklone (Abbildung 31) gewählt, so dass sich jeweils ca. 1-2 % der fluoreszierenden Zellen in ihnen befanden. In der ersten Sortierung wurden insgesamt ca.  $1,44 \cdot 10^5$  Zellen sortiert. Bei der Sortierung wurden durch Region R1 (Präferenz zum R-Enantiomer) ca. 1114 Zellen und durch Region R2 (Präferenz zum S-Enantiomer) ca. 1951 Zellen aussortiert.

Die aussortierten Zellen wurden direkt in zehnfachen Taq-Puffer sortiert. Im Anschluss wurden die in den Zellen enthaltenen Cutinase-Gene mittels PCR hochamplifiziert und in sucrosegereinigten pEst100-Vektor ligiert. Die erhaltenen Transformanten (R1 = 1850; R2 = 4200) wurden erneut mit den Tyramidestern gefärbt und im FACS betrachtet. Im Folgenden wurden die Zellen zur Überprüfung

der Aktivität auf Tributyrinplatten überimpft. Hier zeigten nur wenige Transformanten lipolytische Aktivität ( $R1 = 0,16 \%$ ;  $R2 = 0,43 \%$ ). Die Anzahl der positiven Klone lag somit unter der Anzahl der Ausgangsbibliotheken. Von den aktiven Klonen wurden 3 bzw. 5 Einzelklone in Flüssigmedium angezogen, induziert und mit dem R- und dem S-*p*-Nitrophenylmethyldekanester im Fotometer vermessen. Hier zeigten alle acht Einzelklone keine lipolytische Aktivität. Auch weitere Durchmusterungen mit einer größeren Anzahl an durchmusterten Zellen (ca.  $3,1 \cdot 10^7$ ) führten zum gleichen Ergebnis.

Um zu klären, ob das Färben der Zellen oder die oberflächenexponierte Cutinase der Zellen toxisch für die *E. coli* Zellen sind, wurden aktive Einzelklone aus den Bibliotheken untersucht.

Hierzu wurden von einer Masterplatte Einzelklone zunächst auf Tributyrinplatten überimpft (je 100 Einzelklone pro Bibliothek). Einzelklone, die einen Lysehof und somit Aktivität zeigten, wurden von der Masterplatte (LB-Selektionsplatten) in Flüssigmedium überführt. Für jede Unterbibliothek wurden vier bis zehn aktive Einzelklone je Bibliothek in Flüssigmedium überimpft. Hierbei zeigte lediglich ein Teil der Einzelklone noch Wachstum (Unterbibliothek A: 7 von 10 Einzelklonen; Unterbibliothek B: 0 von 4 Einzelklonen; Unterbibliothek C: 5 von 7 Einzelklonen; Unterbibliothek D: 7 von 9 Einzelklonen; Unterbibliothek E: 4 von 7 Einzelklonen). Die gewachsenen Kulturen wurden induziert und ihre Aktivität wurde fotometrisch mit Nitrophenylestern bestimmt. Hierzu wurden die induzierten Zellen mit PBS gewaschen und für eine möglichst identische Zellmenge für jede Messung wurde die optische Dichte der zu untersuchenden Proben bei 600 nm mit PBS auf einen Wert von 0,5 eingestellt. Als Referenz wurden Zellen, welche kein lipolytisches Enzym (JK321 pEst100) präsentieren, verwendet. Für jede Messung wurde eine Dreifach-Bestimmung mit jedem R- und jedem S-Enantiomer des Nitrophenylmethyldekansäureesters durchgeführt. Hierzu wurden für jede Messung je 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension in eine Kavität einer Mikrotiterplatte gegeben und 30  $\mu\text{l}$  des entsprechenden Esters hinzugegeben. Nach 45 Minuten wurden die Zellen in der Mikrotiterplatte abzentrifugiert, der Überstand in eine neue Mikrotiterplatte überführt und bei 405 nm im ELISA-Reader vermessen. Die so erhaltenen Aktivitäten sind in Abbildung 32 A dargestellt. Die gemessenen Absorptionen entsprechen dem

Substratumsatz des jeweiligen Enantiomers. Aus diesen Werten wurde der apperente E-Wert ermittelt (siehe Abbildung 32 B). Fünf Klone (A3, A4, A5, A7, D4) wurden auf Grund ihrer unterschiedlichen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp zur Sequenzierung ausgewählt. Hierbei wurden vier Klone ausgewählt die eine invertierte Enantioselektivität im bestimmten apparenten E-Wert zeigten, da frühere Aktivitätsmessungen mit dem auf Zellen exponierten wildtyp Enzym eine gewisse Variabilität zeigten. Lediglich drei der aktiven Klone (A4, A7 und D4) konnten sequenziert werden, da auch hier Probleme bei der Anzucht der Klone in Flüssigmedium auftraten. Zwei der Klone (A4 und D4) entsprachen dem wildtyp Enzym. Der dritte Klon (A7) zeigte keine Mutation im Bereich des CASTings, dafür an Aminosäureposition 32. An dieser Position ist das Alanin zu einem Arginin mutiert. Auf Grund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Oberflächenpräsentation der Cutinase auf *E. coli* toxisch ist. Hierbei scheint das oberflächenexponierte wildtyp Enzym einen geringeren Einfluss auf die Überlebensrate zu besitzen.

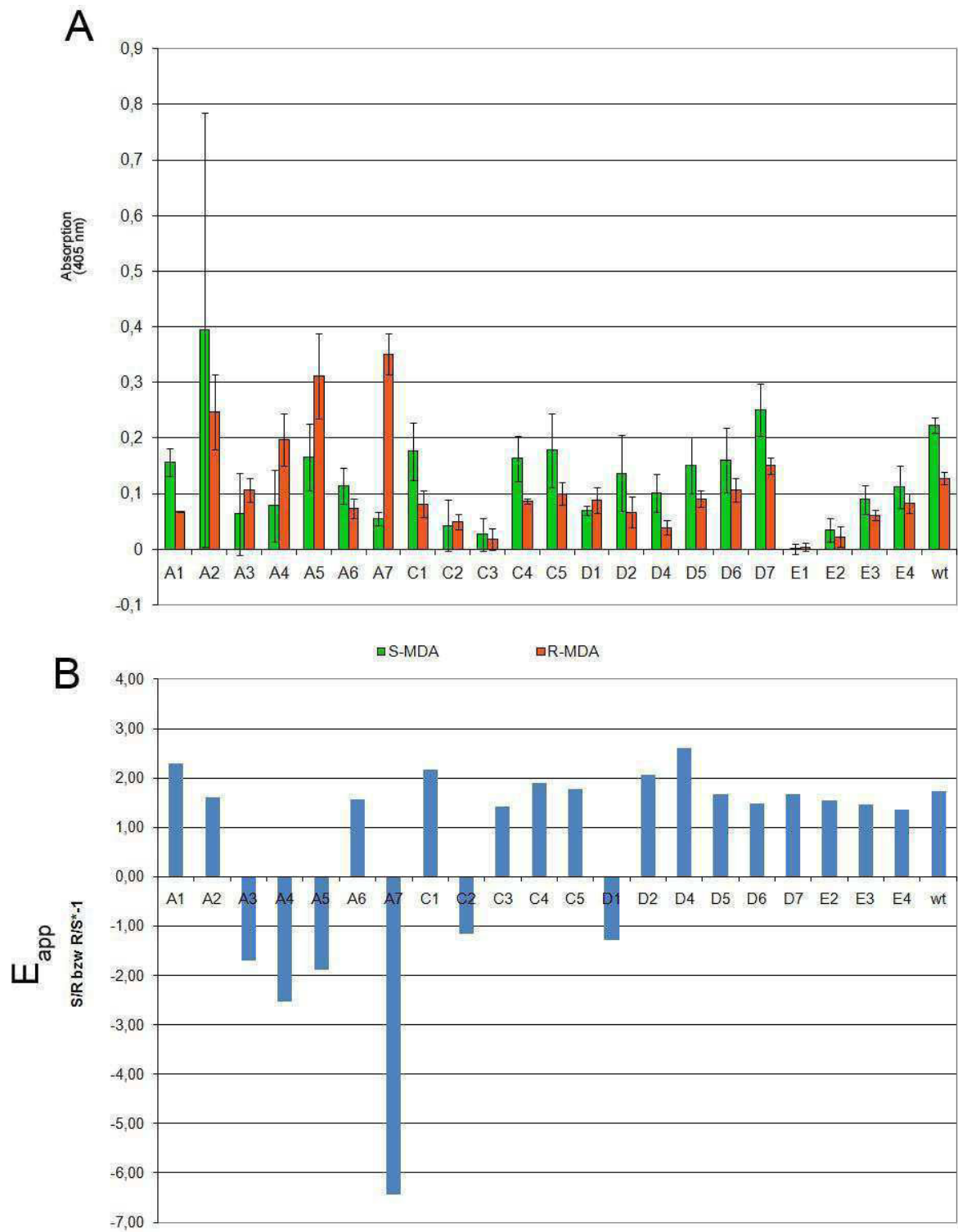


Abbildung 32: Untersuchung aktiver Einzelklone aus den verschiedenen Unterbibliotheken der CAST-Bibliothek  
A) Bestimmung der Aktivität mit R/S-Methyldekanensäure (Endpunktbestimmung nach 45 min) B) ermittelte  
apparente E-Wert für die vermessenen Einzelklone.

#### 4.1.4 Zusammenfassung und Diskussion zur Zelloberflächenpräsentation auf *E. coli*

Für die evolutive Optimierung von Lipasen wurde von S. Becker ein FACS-basiertes *high throughput* Verfahren auf der Oberfläche von *E. coli* entwickelt. Dieses sogenannte ESCAPED-Verfahren beruht auf der Oberflächenkopplung von lipolytischen Enzymen. Als Membrananker wurde hierfür das lipolytische Enzym EstA (Esterase A) aus *Pseudomonas aeruginosa* verwendet (Becker *et al.* 2005). Für diese Esterase A konnten mittels ESCAPED-Verfahren erfolgreich enantioselektive Varianten erhalten werden (Becker *et al.* 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die verkürzte inaktive Esterase als Transporter für andere Lipasen (*Serratia marcescens* Lipase, *Bacillus subtilis* Lipase A und *Fusarium solani pisi* Cutinase) dienen kann und die Produktkopplung des Substrats hier ebenfalls erfolgt (Becker *et al.* 2005).

In diesen Kapiteln wurde das *high throughput* Verfahren auf seine Möglichkeit im Rahmen der enantioselektiven Optimierung von lipolytischen Enzymen untersucht. Hierbei sollte der Einfluss des Membranankers auf lösliche Enzyme anhand des Modellenzym Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* untersucht werden. Diese Lipase ist ein Modellenzym der gerichteten Evolution bezüglich der Enantioselektivität. Neben dem Wildtyp wurde die enantioselektive Variante auf der Oberfläche exponiert, welche den größten Unterschied zum Wildtyp Enzym aufweist.

Als zweites lösliches Enzym wurde die Minimal-Hydrolase Cutinase als Modellenzym zur evolutiven Optimierung verwendet. Hierzu wurden CAST-Bibliotheken generiert und diese mittels ESCAPED-Verfahren untersucht.

Für beide Lipasen konnte gezeigt werden, dass die ESCAPED-Verfahren auf *E. coli* nicht geeignet ist, enantioselektive Varianten dieser lipolytischen Enzyme zu erhalten.



#### 4.1.4.1 *E. coli* Oberflächenpräsentation der Lipase A aus *P. aeruginosa*

Die durchgeführten Experimente zeigen für die Lipase A, dass diese auf der Oberfläche von OmpT-negativen *E. coli* Stämmen präsentiert werden kann. Hierbei zeigt sich kein Unterschied in der Präsentation des Wildtyps und der enantioselektiven Variante. Die präsentierte Lipase zeigt trotz Zugabe der spezifischen Foldase LipH keine lipolytische Aktivität auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Foldase nicht sterisch durch die Esterase gehindert wird und von der Lipase gebunden wird.

Es konnte jedoch keine Aktivität photometrisch gemessen werden. Ausgehend von der Bindung der Foldase wurde vermutet, dass lediglich eine kleine Population der Zellen aktive Lipase präsentiert. Anhand eines Gedankenexperimentes konnte errechnet werden, dass die mögliche vorhandene Enzymaktivität im Hintergrund der Zellen nicht nachweisbar ist.

Diese Annahme ist wahrscheinlich, da im Januar 2010 die aktive Präsentation der Lipase A aus *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas aeruginosa* von (Yang *et al.* 2010) gezeigt wurde. Die Foldasen der beiden Enzyme wurden periplasmatisch exprimiert. Hierzu wurde ein bicistronisches Vektorsystem verwendet. Die gezeigte Aktivität wurde hierbei mit p-Nitrophenyl-Palmitat gemessen. Dieser Ester zeigt eine höhere Stabilität als p-Nitrophenylcaprylat, d.h. er hat eine geringere Hydrolyserate in wässriger Lösung. Das verwendete Oberflächendisplaysystem ist ähnlich zu dem in dieser Arbeit verwendeten System, jedoch nicht identisch. Im Unterschied der hier verkürzten, inaktiven Esterase aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde homolog inaktivierte Esterase aus *Pseudomonas putida* verwendet. Für die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* werden in der Publikation keine direkten Aktivitätswerte gezeigt.

Auf Grund dieser Daten und der Daten für die Bindung von LipH an eine Zellpopulation der LipA präsentierenden Zellen wurden induzierte Zellen mit LipH inkubiert und die Aktivität mittels der ESCAPED-Verfahren untersucht. Ausgehend von einer Population, welche die aktive Lipase präsentiert, könnten über direkte Evolution LipA Varianten selektiert werden, welche eine veränderte Aktivität aufweisen. In der durchgeführten FACS-Analyse konnte keine entsprechende Population ausgemacht werden. Die Histogramme zeigen neben der Hauptpopulation eine weite Streuung der Färbung. Bei diesen gefärbten Events handelt es sich vermutlich um Zelltrümmer, welche unspezifisch mit dem Ester reagieren und somit angefärbt werden. Eine evolutive Optimierung der Lipase A unter Verwendung des FACS-basierten *high-throughput* Systems ist auf Grund der erhaltenen Ergebnisse nicht möglich.

#### **4.1.4.2      *E. coli* Oberflächenpräsentation der Cutinase aus *F. solani pisi***

Für die evolutive Optimierung der Cutinase wurden fünf CAST-Bibliotheken hergestellt. Sowohl durch Durchmusterung der Bibliotheken mittels ESCAPED-Verfahren als auch durch manuelle Durchmusterung konnten keine CAST-Klone mit einer veränderten Enantioselektivität erhalten werden. Lediglich ein Klon zeigte eine Mutation an Position 32 und damit eine veränderte Enantioselektivität. Das Alanin an Position 32, welches zu einem Arginin mutiert war, wurde nicht im Rahmen des CASTings mutiert.

Weitere aktive Klone, welche eine veränderte Enantioselektivität im Enzymtest zeigten, besaßen die wildtyp Sequenz der Cutinase.

Aufgrund dieser Befunde stellen sich folgende Fragen: Sind die gewählten Positionen der CAST-Bibliotheken relevant für die Enantioselektivität der Cutinase und ist das ESCAPED-Verfahren für die evolutive Selektion enantioselektiver Varianten geeignet? Sowohl für die wildtyp Cutinase als auch für Varianten der Cutinase werden in der Literatur dreidimensionale Strukturen sowie eine Reihe an Eigenschaften bezüglich der Dynamik und Substratbindung beschrieben.

Vergleicht man die gewählten CAST-Positionen mit den in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der Cutinase, decken sich die gewählten Positionen mit Positionen, die für die Substratbindung, die Struktur oder/und die Aktivität der Cutinase relevant sind.

Für die randomisierten Positionen Ser42 und Gln121 wurde durch Mutationsstudien und anhand der Kristallstruktur gezeigt, dass diese Positionen die Oxyanion-Tasche ausbilden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das randomisierte Asn84 für die elektrostatische Stabilisierung der aktiven Seite von Bedeutung ist (Longhi und Cambillau 1999). Die randomisierten Positionen Leu81, Asn84, Val177, Leu182 und Val184 sind in zwei hydrophoben Helices lokalisiert (80-87 und 180-188), welche eine Spalte bilden, in dem das katalytische Serin lokalisiert ist. Die beiden Helices stellen die Berührungsfläche für die Substratbindung dar (Martinez *et al.* 1992).

Auf Grund dieser Daten ist davon auszugehen, dass Varianten mit einer geänderten Enantioselektivität mit der CAST-Bibliothek erzeugt wurden.

Während der Selektion zeigte sich bereits, dass die Expression der Cutinase auf der Oberfläche von *E. coli* sowie das anschließende Färben der Zellen toxisch für die *E. coli* Zellen sind. Die Selektion von Varianten konnte auch nicht durch das Einführen eines PCR-Schrittes nach der Sortierung und durch erneutes Klonieren des Cutinase-Gens erhalten werden.

Alle erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die präsentierte Lipase in *E. coli* und besonders veränderte Varianten Stress für den sie präsentierenden *E. coli* bedeuten. Dieser Stress kann sowohl aus der lipolytischen Aktivität als auch aus dem Transport nicht richtig gefalteter Enzyme resultieren.

Bei der Untersuchung von Klonen ohne Induktion der Expression zeigten drei von vier sequenzierten Klonen die wildtyp Sequenz. Dies lässt darauf schließen, dass die Bestimmung der Enantioselektivität mittels photometrischer Bestimmung mit präsentierten lipolytischen Enzymen sehr fehleranfällig ist. Dies beruht sehr wahrscheinlich auf *E. coli*-eigenen lipolytischen Enzymen, welche ebenfalls das Substrat umsetzen und durch Lyse der Zellen freigesetzt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse sowohl für die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* als auch für die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* scheint eine Genotyp-Phänotyp-Kopplung auf *E. coli* Zellen mit anschließender Selektion mittels ESCAPED-Verfahren kein robustes System für die gerichtete Evolution von Lipasen zu sein. Daher wurde ein alternatives System für die Selektion von Lipasen mit veränderter Enantioselektivität im Rahmen dieser Arbeit untersucht (siehe folgende Kapitel). Hierfür wurde das für die Selektion erfolgreich für Binder etablierte System in *S. cerevisiae* verwendet.

## **4.2            Aufbau und Untersuchung eines allgemeinen Verfahrens zur Präsentation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von Hefe**

Dieses Kapitel befasst sich mit der Präsentation lipolytischer Enzyme auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* und der Übertragung des ESCAPED-Verfahrens auf Hefezellen. In der Literatur konnte für die Ganzzell-Katalyse von Estern gezeigt werden, dass die Präsentation lipolytischer Enzyme zu einer höheren Stabilität des präsentierten Enzyms führt. Hierbei zeigten die präsentierten Enzyme neben der erhöhten Stabilität meist ein verändertes Substratspektrum (Su *et al.* 2009). Daher wäre es für die Ganzzell-Katalyse von Interesse, ein auf Hefe basiertes *high throughput* System zu besitzen, welches die evolutive Optimierung von Enzymen auf der Oberfläche ermöglicht. Für die Etablierung dieses Hefesystems wurden die in dieser Arbeit für *E. coli* verwendeten lipolytischen Enzyme, Cutinase aus *Fusarium solani pisi* und Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa*, verwendet sowie die Lipase aus *Bacillus subtilis*.

### **4.2.1            Klonierung lipolytischer Enzyme zur Oberflächenpräsentation auf Hefen**

Für die Präsentation von Enzymen wurde der Vektor pCT (Boder und Wittrup 1997) von der Arbeitsgruppe von J. Cochran (Chemical Engineering & Bioengineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge) zur Verfügung gestellt. Dieser Vektor wurde speziell für die Oberflächenpräsentation sowie die Durchmusterung von Bibliotheken erstellt. Neben dem Replikationsursprung für Hefen (ARS4/CEN6) besitzt dieser Vektor einen Replikationsursprung für Bakterien (pUC ori) und kann so in *E. coli* vervielfältigt werden. Für die Selektion des Plasmids dient das für die Tryptophansynthese essentielle Trp1 Gen, welches dem Stamm EBY100 ermöglicht, auf Selektionsplatten zu wachsen. Die Induktion des Fusionsproteins für die Oberflächenpräsentation erfolgt durch einen Galaktose Promoter (Gal1/10). Als Fusionsprotein wird eine Untereinheit des  $\alpha$ -Agglutinins verwendet (siehe auch 1.3.1.2). Für den Nachweis der Oberflächenpräsentation über Immunofärbung enthält das Fusionsprotein des Weiteren ein Hämagglutinin Epitop (HA-Epitop) und ein c-Myc Epitop.

Bei den Klonierungen der einzelnen Lipasen konnten für die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* nur wenige Einzelklone (n=3) erhalten werden.

#### 4.2.2 Untersuchung der funktionalen Expression der erzeugten Aga2p-Fusionsproteine

Die funktionale Analyse der Fusionsproteine erfolgte auf Tributyrin-Festmedium (3.3.6.1.2). Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen, welche Mcoti, ein Mikroprotein, welches keine lipolytische Aktivität aufweist, präsentierten. Sowohl die Cutinase als auch LipA aus *Bacillus subtilis* zeigten nach Inkubation über zwei Tage bei 30 °C klare Höfe um die Kolonien, welche auf lipolytische Aktivität deuten. Die Negativ-Kontrolle (pCT-Mcoti) zeigte keine Bildung von Höfen. Abbildung 33 zeigt eine Fotografie der betreffenden Tributyrinagarplatte.



Abbildung 33: Funktionale Analyse der Aga2p-Fusionsproteine mittels Tributyrin-Festmedium

1) EBY100 pCT-Mcoti (Negativ-Kontrolle), 2) EBY100 pCT-Cut (Cutinase) und 3) EBY100 pCT-BsLipA (LipA *B. subtilis*)

Für die Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* konnte dieser Aktivitätstest auf Tributyrinplatten nicht erfolgen, da diese Lipase die zugehörige Foldase LipH benötigt, um in den aktiven Zustand überführt zu werden.

#### 4.2.3 Sequenzierung der lipolytischen Enzyme zur Oberflächenpräsentation auf Hefen

Für die aktiven Hefe-Klone der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* und der Lipase aus *Bacillus subtilis* sowie die für die Hefe-Klone der Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde eine Plasmid Präparation durchgeführt mit anschließender Sequenzierung (SeqLab, Göttingen) durchgeführt.

Die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* und die Lipase aus *Bacillus subtilis* zeigten im Vergleich zur wildtyp Sequenz keine Mutationen und konnten somit erfolgreich in *S. cerevisiae*-Vektor pCT kloniert werden. Bei der Lipase von *Pseudomonas aeruginosa* konnte keine vollständige Lipase sequenziert werden. Alle drei erhaltenen Klone zeigten eine verkürzte Variante der Lipase, wobei bei alle das erste Drittel der Sequenz des Wildtyps entsprach und dann in die Sequenz des pCT-Vektors und somit in die Sequenz des myc-Epitops übergang.

#### **4.2.4 Untersuchung der Oberflächenexposition der erzeugten Aga2-Fusionsproteine**

Die Oberflächenexposition der erzeugten Aga2p-Fusionsproteine, der Cutinase sowie LipA aus *Bacillus subtilis* wurde mittels Immunfluoreszenzmarkierung (3.4.3.2) untersucht. Hierzu wurde das sich am Fusionsprotein C-terminale anschließende c-Myc-Epitop über einen monoklonalen Maus-Antikörper (Abcam) angefärbt. Als Positiv-Kontrolle wurden EBY100 pCT-Mcoti Zellen verwendet. Die Analyse der Färbung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 34) und konfokaler Lasermikroskopie (Abbildung 35).

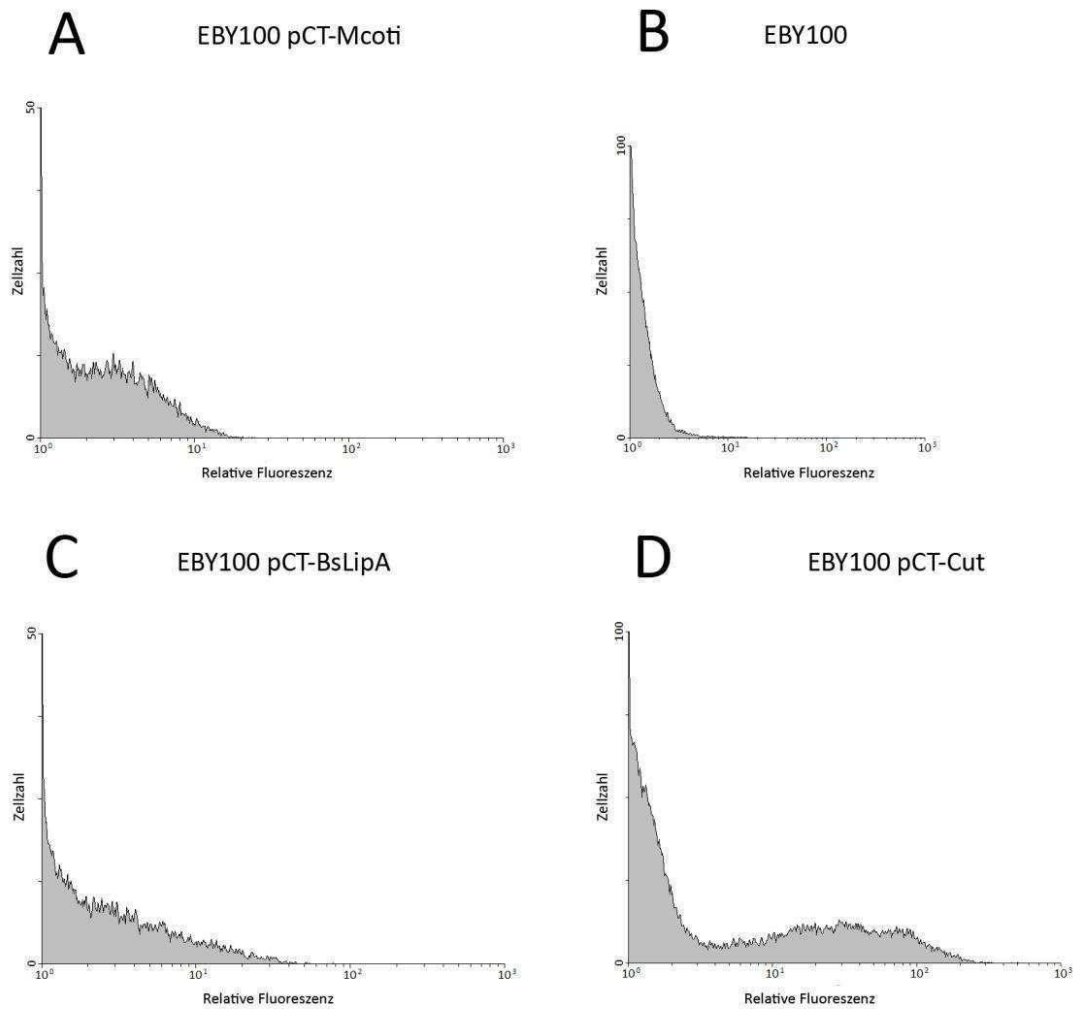


Abbildung 34: FACS-Analyse der auf Hefezellen exponierten lipolytischen Enzyme (Cutinase und *B. subtilis* Lipase)

Die Abbildungen zeigen die Analyse der Oberflächenpräsentation über Immunofärbung mit anti-Myc Antikörper. A) Positiv-Kontrolle der Präsentation (EBY100 pCT-Mcot) mit anti-Myc gefärbt, B) EBY 100 pCT-Cut anti-Myc Färbung und C) EBY100 pCT-BsLipA anti-Myc Färbung.

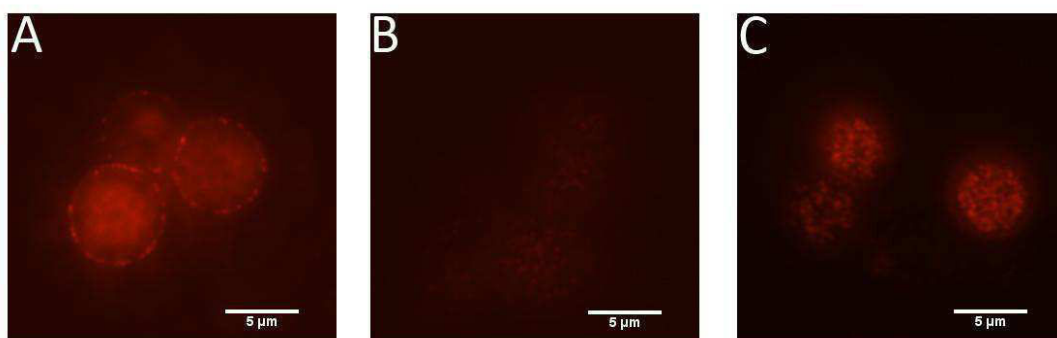


Abbildung 35: Mikroskopische Analyse der Oberflächenpräsentation und der Aktivität der Cutinase und *Bacillus subtilis* Lipase

Die Analyse der Oberflächenpräsentation erfolgte über Immunofärbung. A) Positiv-Kontrolle der Präsentation (EBY100 pCT-Mcot) mit anti-Myc gefärbt, B) EBY 100 pCT-Cut anti-Myc Färbung und C) EBY100 pCT-BsLipA anti-Myc Färbung.



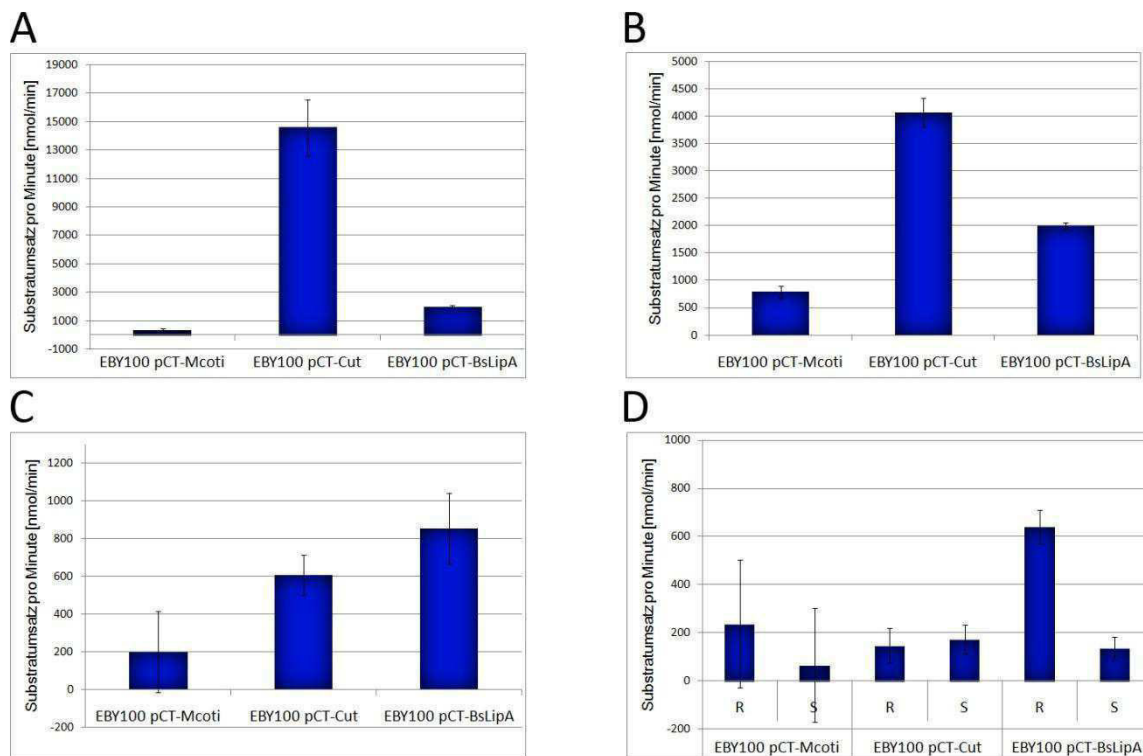
Bei beiden Fusionsproteinen und der Positiv-Kontrolle (EBY100 pCT-Mcoti) konnte das c-Myc-Epitop auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die untransformierten Zellen der Negativ-Kontrolle zeigten kein Signal bei der FACS-Analyse. Im konfokalen Lasermikroskop konnte ebenfalls der Nachweis erfolgen. Insbesondere bei der Färbung der Positiv-Kontrolle (EBY100 pCT-Mcoti) ist die Lokalisierung der Aktivität auf der Oberfläche deutlich auszumachen.

#### **4.2.5 Untersuchung der esterolytischen Aktivität der erzeugten Aga2p-Fusionsproteine**

Die esterolytische Aktivität der erzeugten Aga2p-Fusionsproteine auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* erfolgte zunächst über fotometrischer Bestimmung. Hierzu wurden chromogene p-Nitrophenol-Substrate mit verschiedenen Acylketten verwendet, um den Einfluss des Aga2-Ankers auf die Substratspezifität zu ermitteln. Die präsentierten Enzyme, Cutinase aus *Fusarium solanum pisi* und die Lipase A aus *Bacillus subtilis*, besitzen von Natur aus unterschiedliche Substratumsätze. Die *Bacillus subtilis* Lipase besitzt eine Präferenz für das R- Substrat und für langkettige Ester. Die Cutinase hingegen besitzt eine geringe Präferenz zum S- Enantiomer und setzt im Gegensatz zur *Bacillus subtilis* Lipase kurzkettige Ester besser um. Als kurzkettiger Ester wurden p-Nitrophenylbutyrat (C4) und p-Nitrophenylcaprylat (C8) verwendet. Als langkettiger Ester wurde p-Nitrophenylpalmitat (C16) verwendet. Zur Klärung der Enantioselektivität wurde die Enantiomere des p-Nitrophenylmethyldekansäureesters verwendet.

Sämtliche Messungen wurden mit einer konstanten Zelldichte durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Hydrolyserate zu erhalten. Hierzu wurde die optische Dichte bei 600 nm der Zellen im Enzymtestpuffer auf 0,3 eingestellt. Zur Bestimmung der Hydrolyserate wurden je drei unabhängige Bestimmungen für jedes Substrat mit je fünf Zeitwerten durchgeführt.

Hierbei zeigte die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* die in der Literatur beschriebene Präferenz zu kurzkettigen Estern und die Lipase aus *Bacillus subtilis* die Präferenz zu länger-kettigen Estern. Die Methyldekansäureester wurden von beiden Enzymen umgesetzt (Becker 2007). Die beschriebenen Enantioselektivitäten konnten für beide Enzyme gezeigt werden. Hierbei unterschieden sich die  $E_{app}$ -Werte jedoch von den Werten, die für die Oberflächenexpression auf *E. coli* beschrieben sind (siehe Tabelle 15) (Becker 2007). Neben den beiden Membranankern ist die Variabilität auf die Anwesenheit der Zellen im jeweiligen Testansatz und der damit verbundenen Hintergrundaktivität zurückzuführen.



**Abbildung 36: Photometrische Bestimmung der Aktivität der auf Hefe exponierten Enzyme**  
 Substratumsätze der oberflächenpräsentierten lipolytischen Enzyme *B. subtilis* LipA und *F. solani pisi* Cutinase gegenüber A) p-Nitrophenylbutyrat, B) p-Nitrophenylcaprylat, C) p-Nitrophenylpalmitat und D) R-Methyldekansäure p-Nitrophenylester und S-Methyldekansäure p-Nitrophenylester (S)-2-MDA-p-Nitrophenylester (Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von Messungen, die dreifach durchgeführt wurden).

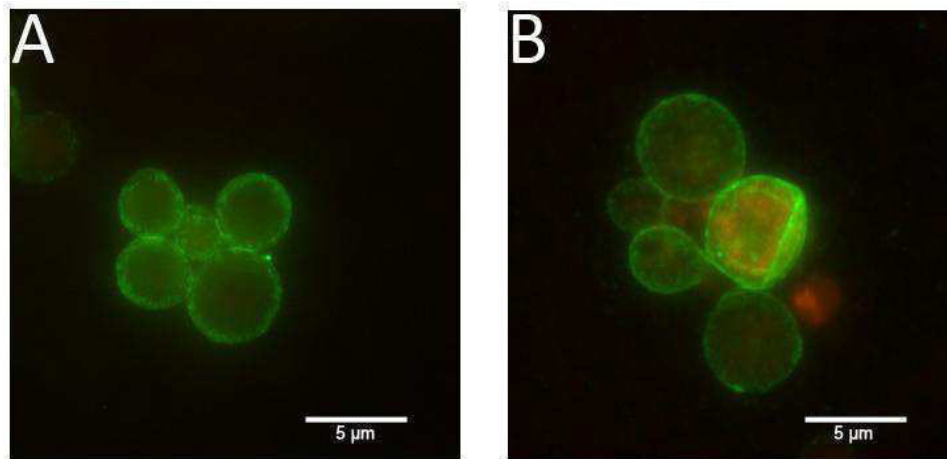
**Tabelle 14: Apparente  $E_{app}$ -Werte der oberflächenexponierten Enzyme auf *E. coli* und *S. cerevisiae***

	EstA-Fusionsprotein Oberflächenpräsentation auf <i>E. coli</i>	Aga2-Fusionprotein Oberflächenpräsentation auf <i>S. cerevisiae</i>
Lipase aus <i>Bacillus subtilis</i>	$E_{Sapp}$ 2,1	$E_{Sapp}$ 1,2
Cutinase aus <i>Fusarium solani pisi</i>	$E_{Rapp}$ 5,2	$E_{Rapp}$ 4,5

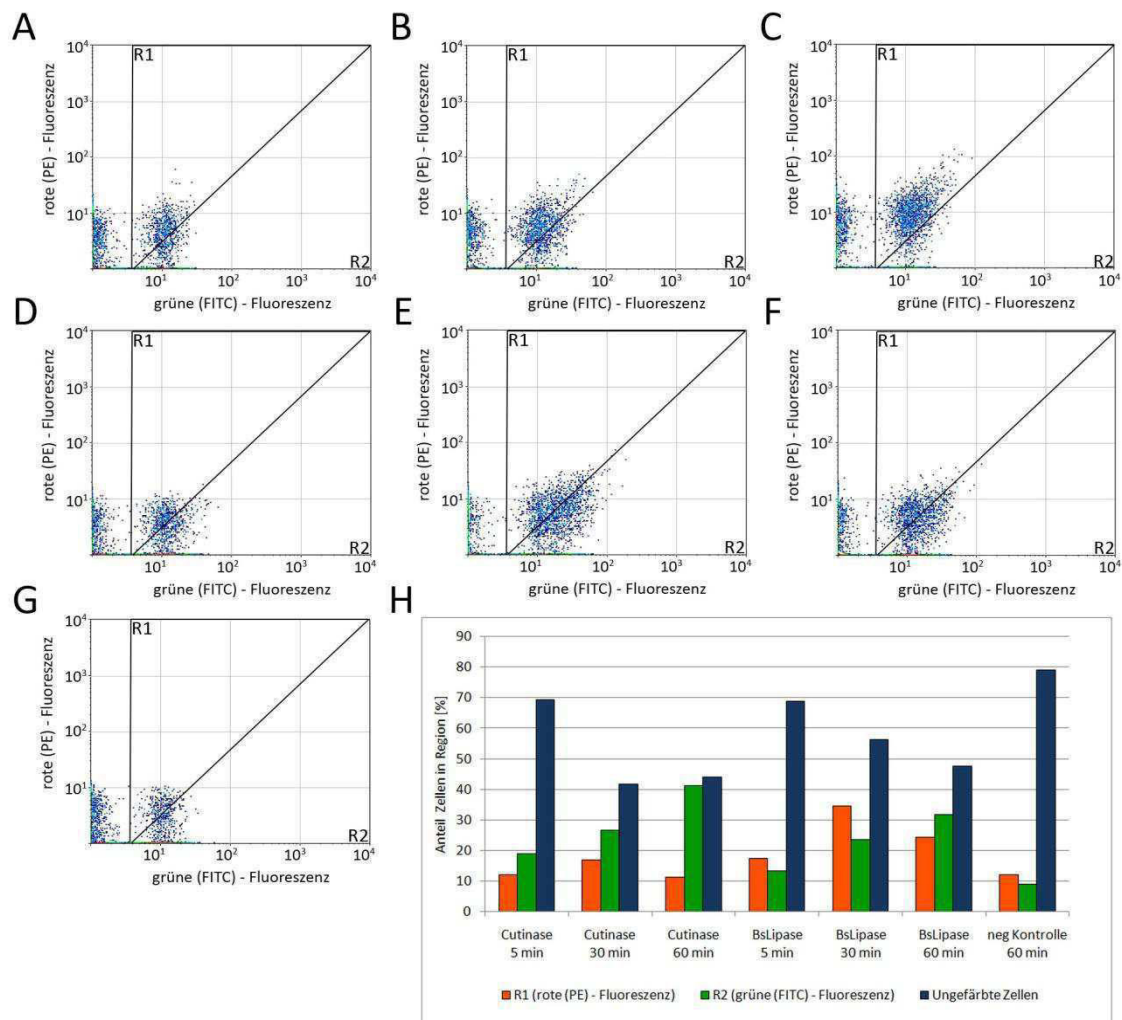
#### 4.2.6 Übertragung des ESCAPED-Verfahrens auf Hefezellen

Nach der erfolgreichen aktiven Präsentation der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* und der Lipase aus *Bacillus subtilis* wurde das auf *E. coli* entwickelte ESCAPES-Verfahren auf Hefe-Zellen übertragen. Hierzu wurden die induzierten Hefezellen zunächst auf eine einheitliche Zellkonzentration gebracht. Die Kopplung der für die Reaktion notwendigen Meerrettich-Peroxidase erfolgte analog zu der Kopplung der *E. coli* Zellen für eine Stunde abgedunkelt bei RT. Bei dem sich anschließenden Waschschrift zeigten die mit Peroxidase behandelten Hefezellen eine erhöhte Aggregation. Daher wurde die Anzahl der Waschschriffe erhöht, bis eine homogene Hefezellen-Suspension vorlag. Die enzymatische Reaktion der Tyramidester sowie die Anfärbung des gekoppelten Produkts mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte wie zuvor bei *E. coli* Zellen. Hierbei wurden zunächst Endpunktbestimmungen mit verschiedener Substratinkubation vorgenommen (Abbildung 38). Nach einer Substratinkubationszeit von 60 Minuten zeigte sich für die lipolytisch Aktiven Zellen, dass sich die Enzymreaktion in der Sättigung befindet. Für die weiteren Färbungen wurde eine Inkubationszeit von 30 Minuten gewählt. Die so gefärbten Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierbei zeigten alle Zeitpunkte die Färbung auf der Oberfläche der Zelle.

Abbildung 37 zeigt Zellen nach 30 Minuten Inkubation mit dem Substrat. Die Färbung mit Phycoerythrin bleichte durch die Anregung relative schnell aus, daher scheint diese Färbung in der Mikroskopaufnahme deutlich geringere.



**Abbildung 37: Analyse der Aktivitätsmessung auf der Zelloberflächen mittels Mikroskopie**  
Für den Nachweis der Aktivität wurden die Zellen mit (R/S)-Methyldekansäureester-Tyramid-Konjugat im konfokalen Lasermikroskop betrachtet (A und B). Aufnahme A zeigt die Aktivitätsfärbung von EBY100 pCT-Cut und Abbildung B die Aktivitätsfärbung von EBY100 pCT-LipABs.



**Abbildung 38: Aktivitätsmessung der oberflächenexponierten, lipolytischen Enzyme mittels FACS-Analyse**  
Für die Aktivitätsmessungen der Cutinase (EBY100 pCT-Cut) und der *Bacillus subtilis* Lipase (EBY100 pCT-LipABs) wurden Octansäure-Tyramidester-Konjugate und (R/S)-Methyldekansäureester-Tyramid-Konjugat verwendet. Für die Messung der Enantiomere wurde für die Färbung die Fluorophore FITC (R-Enantiomer/Kanal 2) und PE (S-Enantiomer/Kanal 1) verwendet. A-C) Cutinase (EBY100 pCT-Cut) D-F) *Bacillus subtilis* Lipase (EBY100 pCT-LipABs) je 5 min, 30 min und 60 min

#### **4.2.6.1 Einfluss der Färbung auf Zellen und Bestimmung der Überlebensrate**

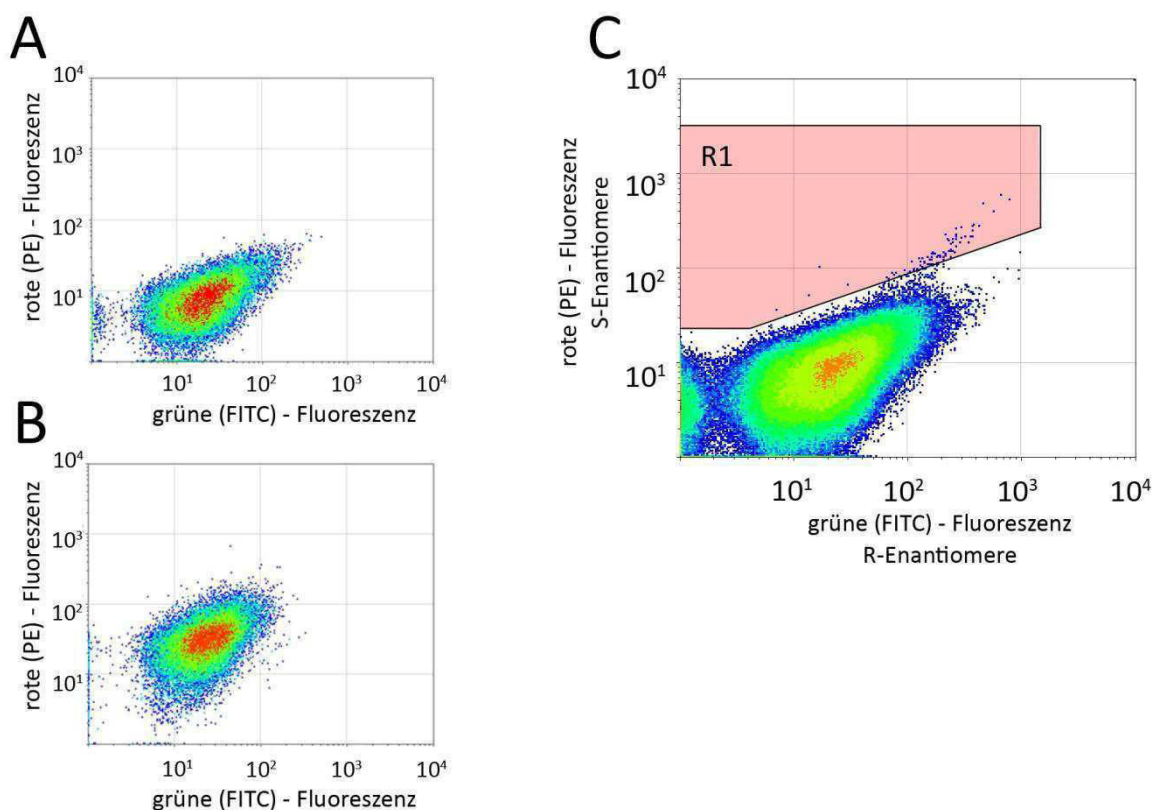
Nach erfolgreicher Etablierung des für *E. coli* entwickelten ESCAPED-Verfahrens auf Hefe-Zellen wurde zunächst die Überlebensrate für beide Enzyme getestet. Hierzu wurden die Zellen wie zuvor induziert und im Anschluss gefärbt. Für die Färbung wurde p-Nitrophenylcaprylat verwendet. Die Substratinkubation erfolgte für 20 min. Nach der Fluoreszenzfärbung der Zellen wurden je 200 Einzelklone auf SDCAA-Platten sortiert. Nach drei Tagen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank konnten Einzelkolonien ausgemacht werden. Nach dem Auszählen ergaben sich für EBY100 pCT-LipABs 198 Einzelkolonien und für EBY100 pCT-Cut 199 Einzelkolonien. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Überlebensrate bei ca. 100 % liegt.

Im Folgenden wurden zur Überprüfung der Enzymaktivität je 30 Einzelklone auf Tributyrinplatten überimpft. Hier zeigten alle Einzelklone eine lipolytische Aktivität.

#### **4.2.6.2 Nachweis einer erfolgreichen Selektion von aktiven Enzymvarianten durch ein Mischungsexperiment**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Überlebensrate und die Aktivität der Einzelklone nicht durch die Präsentation und die Aktivitätsfärbung beeinträchtigt werden, wurde ein Mischungsexperiment mit Cutinase-präsentierenden Zellen durchgeführt. In diesem Experiment sollte gezeigt werden, dass lipolytisch aktive Zellen von nicht lipolytisch aktiven Zellen bei der FACS-Analyse unterschieden werden können und aussortiert werden können. Für das Mischungsexperiment wurden *S. cerevisiae* EBY100 pCT-Cut Zellen und *S. cerevisiae* EBY100 pCT-Mcoti Zellen angezogen und induziert. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und auf die gleiche Absorption gebracht. Anschließend wurden die lipolytisch aktiven Zellen (*S. cerevisiae* EBY100 pCT-Cut) im Verhältnis 1:1000 mit den nicht lipolytisch aktiven Zellen (*S. cerevisiae* EBY100 pCT-Mcoti) gemischt. Die gemischten Zellen sowie die ungemischten Hefezellen wurden wie zuvor mit (R/S)-Methyldekansäureester-Tyramid-Konjugat gefärbt. Abbildung 39 zeigt die gefärbten, nicht lipolytisch aktiven *S. cerevisiae* EBY100 pCT-Mcoti Zellen (A), die lipolytisch aktiven *S. cerevisiae* EBY100 pCT-Cut Zellen(B) sowie die Zellen der 1:1000 Mischung (C). Neben dem Fluoreszenzsignal der gefärbten Zellen ist in Abbildung 39 C das Sortierungsfenster (R1) dargestellt. In diesem Sortierungsfenster befinden sich bei den *S. cerevisiae*

EBY100 pCT-Mcoti Zellen (Abbildung 39 A) 0,2 % und bei den *S cerevisiae* EBY100 pCT-Cut Zellen (Abbildung 39 B) 42 % der Zellen. Somit sollte jeder zehnte Klon in diesem Sortierungsfenster ein *S cerevisiae* EBY100 EBY100 pCT-Cut Klon sein. Für das Mischungsexperiment wurden insgesamt  $3,5 \cdot 10^5$  Zellen betrachtet, wobei 930 Zellen aussortiert wurden. Diese wurden wie zuvor auf SDCAA-Platten angezogen. Im Anschluss wurden 30 Klone auf Tributyrinagar überimpft. Von den untersuchten 30 Einzelklonen konnte bei drei der auf Aktivität untersuchten Einzelklonen Aktivität anhand von Lysehöfe festgestellt werden. Dies stimmt genau mit der kalkulierten Anzahl überein.



**Abbildung 39: Mischungsexperiment: Sortierung eines Gemisches aus lipolytisch aktiven und inaktiven oberflächenpräsentierenden Hefezellen nach oberflächen gekoppelter Aktivitätsfärbung**  
Bei dem Mischungsexperiment wurde EBY100 pCT-Cut Zellen 1:1000 in EBY pCT-Mcoti Zellen gegeben. Diese Abbildung zeigt die Analyse der mit (R/S)-Methyldekansäureester-Tyramid-Konjugat gefärbten A) *S cerevisiae* EBY100 pCT-Cut-Zellen, B) *S cerevisiae* EBY100 pCT-Mcoti Zellen sowie C) die gemischten *S cerevisiae* EBY100 pCT-Cut und *S cerevisiae* EBY100 pCT-Mcoti Zellen (1:1000). Neben dem Fluoreszenzsignal der gefärbten Zellen ist in C das Sortierungsfenster (R1) des Mischungsexperiments dargestellt

#### **4.2.7 Zusammenfassung und Diskussion zur Zelloberflächenpräsentation auf Hefe**

Das FACS-basiertes *high throughput* Verfahren auf der Oberfläche von *E. coli* (ESCAPED-Verfahren) zur evolutiven Optimierung von Lipasen konnte erfolgreich auf Hefen (*Saccharomyces cerevisiae* EBY100) übertragen werden.

Die Untersuchungen hierzu erfolgte an drei lipolytischen Enzyme, der Cutinase aus *Fusarium solani pisi*, der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* und der Lipase aus *Bacillus subtilis*.

Die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* konnte nicht erfolgreich mit dem Hefesystem präsentiert werden, da nur verkürzte Enzymvarianten in der Klonierung erhalten wurden.

Die beiden Minimal-Hydrolasen konnten erfolgreich präsentiert werden. Für beide Enzyme konnte gezeigt werden, dass eine funktionale Präsentation mittels Aga2-Fusion auf Hefe möglich ist und das ESCAPED-Verfahren auf Hefe anwendbar ist. Durch Bestimmung der Überlebensrate sowie durch ein Mischungsexperiment wurde gezeigt, dass dieses Hefe-System sich für die Selektion enantioselektive Varianten dieser lipolytischen Enzyme eignet.

##### **4.2.7.1 Oberflächenpräsentation der Lipase A aus *P. aeruginosa* auf *S. cerevisiae***

Für die Lipase A aus *Pseudomonas aeruginosa* konnte keine erfolgreiche Oberflächenpräsentation erhalten werden. Bei der Klonierung konnten nur wenige Einzelklone erhalten werden. Diese zeigten in der Sequenzierung verkürzte LipA Varianten, obwohl das verwendete PCR-Produkt die entsprechende Größe der Lipase A aufzeigte.

Folgende zwei Ursachen für das Nichterhalten von volllängen Fusionsproteinen sind vorstellbar:

- 1) Durch das in Hefen vorhandene URP-System (*unfolded protein response*-System) wird die Lipase in der Zelle in die aktive Form überführt. Durch die jetzt vorhandene lipolytische Aktivität kommt es in der Zelle zum unkontrollierten Abbau von Proteinen, welcher zum Zelltod führt.

- 2) Die Lipase kann nicht durch die Hefe-Chaperone in eine gefaltete Konformation gelangen und wird über das ER-assoziierte Protein-Degradationssystem („ER-associated protein degradation“; ERAD) abgebaut. Dieser Abbau führt zur Apoptose der Hefezellen.

Im Falle der Verantwortlichkeit der lipolytische Aktivität für das Nichterhalten von volllängen Fusionsprotein stellt sich die Frage, ob bei einer evolutiven Optimierung mit diesem System nicht gesuchte Varianten auf Grund von Zellstress nicht selektiert werden können. Dies könnte über die Klonierung einer inaktiven LipA-Variante überprüft werden. Da die Lipase aus *Bacillus subtilis* und die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* jedoch erfolgreich kloniert werden konnten, ist die zweite Ursache bezüglich der Faltung wahrscheinlicher. Hier könnte durch eine Co-Expression der zugehörigen Foldase ein Präsentieren der Lipase erreicht werden.

#### **4.2.7.2      *S. cerevisiae* Oberflächenpräsentation der Cutinase aus *F. solani pisi***

Für die Adaption des ESCAPED Verfahrens auf Hefen (*Saccharomyces cerevisiae* EBY100) wurde die Cutinase aus *Fusarium solani pisi* über den Membrananker Aga2 auf Hefen präsentiert.

Für die Cutinase konnte gezeigt werden, dass sie in aktiver Form auf der Oberfläche vorliegt und dass das Fusionsprotein die Enantioselektivität nicht beeinträchtigt.

Des Weiteren wurde die Überlebensrate der präsentierenden *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 Zellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ca. 100 % der Zellen überleben und diese Enzymaktivität zeigen.

Dies zeigt, dass die lipolytische Aktivität keinen gravierenden Stress auf die Hefe-Zelle ausübt und dass die Aktivitätsfärbung ohne den Verlust von aktiven Einzelklonen möglich ist.

Nach der experimentellen Bestätigung, dass die Aktivitätsfärbung erfolgreich auf Hefen durchgeführt werden kann, wurde ein Mischungsexperiment mit nicht lipolytisch aktiven Zellen und den lipolytisch aktiven Cutinase-präsentierenden Zellen durchgeführt. Dieses zeigte, dass eine Selektion aktiver Klone zuverlässig möglich ist.

Auf Grund dieser experimentellen Daten zeigt sich, dass das Hefe-System deutlich besser geeignet ist für die *high throughput* Selektion von enantioselektiven lipolytischen Enzymen als das bislang verwendete *E. coli*-System.



#### 4.2.7.3 *S. cerevisiae* Oberflächenpräsentation der Lipase aus *B. subtilis*

Neben der Cutinase aus *Fusarium solani pisi* konnte die Lipase aus *Bacillus subtilis* erfolgreich auf *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 über den Membrananker Aga2 präsentiert werden. Für dieses lipolytische Enzym konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es in aktiver Form auf der Oberfläche vorliegt und das Fusionsprotein die Enantioselektivität nicht beeinträchtigt.

Des Weiteren wurde auch für die Lipase aus *Bacillus subtilis* gezeigt, dass die Überlebensrate der präsentierenden *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 Zellen rund 100 % beträgt und die Lipase-Aktivität der Zellen erhalten bleibt.

Hieraus lässt sich schließen, dass das Hefe-System ein robustes System zur oberflächen Präsentation lipolytischer Enzyme ist und wie auch schon für Antikörper gezeigt, die Basis für ein erfolgreiches *high throughput* Verfahren für die evolutive Optimierung von Proteinen darstellt.

## 5 Literatur

- Acharya, P.; Rajakumara, E.; Sankaranarayanan, R.; Rao, N. M. (2004): Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase. In: *J. Mol. Biol.* 341 (5), S. 1271–1281.
- Ahmad, S.; Kamal, M. Z.; Sankaranarayanan, R.; Rao, N. M. (2008): Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: in vitro evolution and structural insight. In: *J. Mol. Biol.* 381 (2), S. 324–340.
- Antipov, E.; Cho, A. E.; Wittrup, K. D.; Klibanov, A. M. (2008): Highly L and D enantioselective variants of horseradish peroxidase discovered by an ultrahigh-throughput selection method. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (46), S. 17694–17699.
- Aoki, T.; Tahara, T.; Fujino, H.; Watabe, H. (2002): "GFP-display," an easy detection method for single amino acid changes in a target polypeptide: application to random mutagenesis. In: *Anal. Biochem.* 300 (1), S. 103–106.
- Arpigny, J. L.; Jaeger, K. E. (1999): Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. In: *Biochem. J.* 343 Pt 1, S. 177–183.
- Bae, W.; Chen, W.; Mulchandani, A.; Mehra, R. K. (2000): Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatins. In: *Biotechnol. Bioeng.* 70 (5), S. 518–524.
- Bae, W.; Mulchandani, A.; Chen, W. (2002): Cell surface display of synthetic phytochelatins using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. In: *J. Inorg. Biochem.* 88 (2), S. 223–227.
- Bae, W.; Wu, C. H.; Kostal, J.; Mulchandani, A.; Chen, W. (2003): Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed MerR. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6), S. 3176–3180.
- Barbas, C. F. (2001): Phage-Display. A laboratory manual. Cold Spring Harbor NY: CSHL Press.
- Bartsch, S.; Kourist, R.; Bornscheuer, U. T. (2008): Complete inversion of enantioselectivity towards acetylated tertiary alcohols by a double mutant of a *Bacillus subtilis* esterase. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (8), S. 1508–1511.
- Becker, S. (2007): Neue Zugänge zu enantioselektiven lipolytischen Enzymen durch fluoreszenzbasierte Durchmusterung kombinatorischer Bibliotheken. Universität, Göttingen
- Becker, S.; Höbenreich, H.; Vogel, A.; Knorr, J.; Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Jaeger K. E.; Reetz M.T.; Kolmar H. (2008): Single-cell high-throughput screening to identify enantioselective hydrolytic enzymes. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (27), S. 5085–5088.
- Becker, S.; Michalczyk, A.; Wilhelm, S.; Jaeger, K. E.; Kolmar, H. (2007): Ultrahigh-throughput screening to identify *E. coli* cells expressing functionally active enzymes on their surface. In: *Chembiochem* 8 (8), S. 943–949.

- Becker, S.; Theile, S.; Heppeler, N.; Michalczyk, A.; Wentzel, A.; Wilhelm, S.; Jaeger K. E.; Kolmar H (2005): A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. In: *FEBS Lett.* 579 (5), S. 1177–1182.
- Benhar, I.; Azriel, R.; Nahary, L.; Shaky, S.; Berdichevsky, Y.; Tamarkin, A.; Wels, W. (2000): Highly efficient selection of phage antibodies mediated by display of antigen as Lpp-OmpA' fusions on live bacteria. In: *J. Mol. Biol.* 301 (4), S. 893–904.
- Bessette, P. H.; Rice, J. J.; Daugherty, P. S. (2004): Rapid isolation of high-affinity protein binding peptides using bacterial display. In: *Protein Eng. Des. Sel.* 17 (10), S. 731–739.
- Binder, U.; Matschiner, G.; Theobald, I.; Skerra, A. (2010): High-throughput sorting of an Anticalin library via EspP-mediated functional display on the *Escherichia coli* cell surface. In: *J. Mol. Biol.* 400 (4), S. 783–802.
- Bingle, W. H.; Nomellini, J. F.; Smit, J. (1997): Cell-surface display of a *Pseudomonas aeruginosa* strain K pilin peptide within the paracrystalline S-layer of *Caulobacter crescentus*. In: *Mol. Microbiol.* 26 (2), S. 277–288.
- Bobrow, L. G.; Hirsch, F. R.; Hay, F. G.; Happerfield, L.; Skov, B. G.; Law, K. Leonard R. C.; Souhami R. L. (1992): An immunohistochemical investigation of diagnostic biopsy material taken from short and long term survivors with small cell lung cancer. In: *Br. J. Cancer* 66 (3), S. 547–551.
- Boder, E. T.; Wittrup, K. D. (1997): Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. In: *Nat. Biotechnol.* 15 (6), S. 553–557.
- Boersma, Y. L.; Dröge, M. J.; van der Sloot, A. M.; Pijning, T.; Cool, R. H.; Dijkstra, B. W.; Quax, W. J. (2008): A novel genetic selection system for improved enantioselectivity of *Bacillus subtilis* lipase A. In: *Chembiochem* 9 (7), S. 1110–1115.
- Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. (2006): Hydrolases in organic synthesis. Regio- and stereoselective biotransformations. 2. ed. Weinheim.
- Brockerhoff, H. (1969): Action of pancreatic lipase on emulsions of water-soluble esters. In: *Arch Biochem Biophys (Archives of Biochemistry and Biophysics)* (134(2)), S. 366–371.
- Brumlik, M. J.; van der Goot, F. G.; Wong, K. R.; Buckley, J. T. (1997): The disulfide bond in the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase stabilizes the structure but is not required for secretion or activity. In: *J. Bacteriol.* 179 (10), S. 3116–3121.
- Casali, N.; Konieczny, M.; Schmidt, M. A.; Riley, L. W. (2002): Invasion activity of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by the *Escherichia coli* AIDA autotransporter. In: *Infect. Immun.* 70 (12), S. 6846–6852.
- Chang, H. J.; Sheu, S. Y.; Lo, S. J. (1999): Expression of foreign antigens on the surface of *Escherichia coli* by fusion to the outer membrane protein traT. In: *J. Biomed. Sci.* 6 (1), S. 64–70.
- Chang, H.; Lo, S. J. (2000): Modification with a phosphorylation tag of PKA in the TraT-based display vector of *Escherichia coli*. In: *J. Biotechnol.* 78 (2), S. 115–122.

- Chao, G.; Lau, W. L.; Hackel, B. J.; Sazinsky, S. L.; Lippow, S. M.; Wittrup, K. D. (2006): Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. In: *Nat Protoc* 1 (2), S. 755–768.
- Chao, J.; DeBiasio, R.; Zhu, Z.; Giuliano, K. A.; Schmidt, B. F. (1996): Immunofluorescence signal amplification by the enzyme-catalyzed deposition of a fluorescent reporter substrate (CARD). In: *Cytometry* 23 (1), S. 48–53.
- Chen, C. S.; Wu, S. H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. (1987): Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems. In: *Journal of the American Chemical Society* 109 (9), S. 2812–2817.
- Cho, C. M.-H.; Mulchandani, A.; Chen, W. (2002): Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4), S. 2026–2030.
- Danielsen, S.; Eklund, M.; Deussen, H. J.; Gräslund, T.; Nygren, P. A.; Borchert, T. V. (2001): *In vitro* selection of enzymatically active lipase variants from phage libraries using a mechanism-based inhibitor. In: *Gene* 272 (1-2), S. 267–274.
- Dartois, V.; Baulard, A.; Schanck, K.; Colson, C. (1992): Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1131 (3), S. 253–260.
- Dartois, V.; Coppée, J. Y.; Colson, C.; Baulard, A. (1994): Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (5), S. 1670–1673.
- Desvaux, M.; Dumas, E.; Chafsey, I.; Hébraud, M. (2006): Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 256 (1), S. 1–15.
- Dhillon, J. K.; Drew, P. D.; Porter, A. J. (1999): Bacterial surface display of an anti-pollutant antibody fragment. In: *Lett. Appl. Microbiol.* 28 (5), S. 350–354.
- Dodson, G.; Wlodawer, A. (1998): Catalytic triads and their relatives. In: *Trends Biochem. Sci.* 23 (9), S. 347–352.
- Dower, W. J.; Miller, J. F.; Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. In: *Nucleic Acids Res.* 16 (13), S. 6127–6145.
- Dröge, M. J.; Boersma, Y. L.; van Pouderoyen, G.; Vrenken, T. E.; Rüggeberg, C. J.; Reetz, M. T.; Dijkstra B. W.; Quax W. J. (2006): Directed evolution of *Bacillus subtilis* lipase A by use of enantiomeric phosphonate inhibitors: crystal structures and Phage-Display selection. In: *Chembiochem* 7 (1), S. 149–157.
- Eggert, T.; van Pouderoyen, G.; Dijkstra, B. W.; Jaeger, K. E. (2001): Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. In: *FEBS Lett.* 502 (3), S. 89–92.

- El Khattabi, M.; van Gelder, P.; Bitter, W.; Tommassen, J. (2000): Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. In: *J. Biol. Chem.* 275 (35), S. 26885–26891.
- Filloux, A.; Michel, G.; Bally, M. (1998): GSP-dependent protein secretion in gram-negative bacteria: the Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *FEMS Microbiol. Rev.* 22 (3), S. 177–198.
- Francisco, J. A.; Campbell, R.; Iverson, B. L.; Georgiou, G. (1993a): Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (22), S. 10444–10448.
- Francisco, J. A.; Earhart, C. F.; Georgiou, G. (1992): Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of *Escherichia coli*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (7), S. 2713–2717.
- Francisco, J. A.; Stathopoulos, C.; Warren, R. A.; Kilburn, D. G.; Georgiou, G. (1993b): Specific adhesion and hydrolysis of cellulose by intact *Escherichia coli* expressing surface anchored cellulase or cellulose binding domains. In: *Biotechnology (N.Y.)* 11 (4), S. 491–495.
- Frenken, L. G.; Groot, A. de; Tommassen, J.; Verrips, C. T. (1993): Role of the lipB gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. In: *Mol. Microbiol.* 9 (3), S. 591–599.
- Funke, S. A.; Eipper, A.; Reetz, M. T.; Otte, N.; Thiel, W.; van Pouderoyen, G.; Dijkstra, B. W.; Jaeger, K. E.; Eggert, T. (2003): Directed Evolution of an Enantioselective *Bacillus subtilis* Lipase - Biocatalysis and Biotransformation. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 2003, 2003 (21), S. 67–73.
- Griffiths, A. D.; Tawfik, D. S. (2006): Miniaturising the laboratory in emulsion droplets. In: *Trends Biotechnol.* 24 (9), S. 395–402.
- Habicht, G.; Haupt, C.; Friedrich, R. P.; Hortschansky, P.; Sachse, C.; Meinhardt, J.; Wieligmann, K.; Gellermann, G. P.; Brodhun, M.; Götz, J.; Halbhuber, K. J.; Röcken, C.; Horn, U.; Fändrich, M. (2007): Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (49), S. 19232–19237.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J. Mol. Biol.* 166 (4), S. 557–580.
- Hasan, F.; Shah, Aamer A.; Hameed, A. (2006): Industrial applications of microbial lipases. In: *Enzyme Microb. Technol. (Enzyme and Microbial Technology)* (39), S. 235–251.
- Hausmann S. (2008): Einfluss des Lipase-spezifischen Chaperons LipH auf die Faltung und Sekretion der Lipasen LipA und LipC aus *Pseudomonas aeruginosa*. Universität, Düsseldorf
- Ho, S. N.; Hunt, H. D.; Horton, R. M.; Pullen, J. K.; Pease, L. R. (1989): Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. In: *Gene* 77 (1), S. 51–59.

- Hobson, A. H.; Buckley, C. M.; Jørgensen, S. T.; Diderichsen, B.; McConnell, D. J. (1995): Interaction of the *Pseudomonas cepacia* DSM3959 lipase with its chaperone, LimA. In: *J. Biochem.* 118 (3), S. 575–581.
- Holmquist, M. (1998): Insights into the molecular basis for fatty acyl specificities of lipases from *Geotrichum candidum* and *Candida rugosa*. In: *Chem. Phys. Lipids* 93 (1-2), S. 57–66.
- Holmquist, M.; Tessier, D. C.; Cygler, M. (1997): Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II. In: *Biochemistry* 36 (48), S. 15019–15025.
- Hoogenboom, H. R. (2002): Overview of antibody phage-display technology and its applications. In: *Methods Mol. Biol.* 178, S. 1–37.
- Hoogenboom, H. R. (2005): Selecting and screening recombinant antibody libraries. In: *Nat. Biotechnol.* 23 (9), S. 1105–1116.
- Hult, K.; Berglund, P. (2003): Engineered enzymes for improved organic synthesis. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (4), S. 395–400.
- Hunyady, B.; Krempels, K.; Harta, G.; Mezey, E. (1996): Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. In: *J. Histochem. Cytochem.* 44 (12), S. 1353–1362.
- Ihara, F.; Okamoto, I.; Akao, K.; Nihira, T.; Yamada, Y. (1995): Lipase modulator protein (LimL) of *Pseudomonas* sp. strain 109. In: *J. Bacteriol.* 177 (5), S. 1254–1258.
- Jaeger, K. E.; Reetz, M. T. (1998): Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. In: *Trends Biotechnol.* 16 (9), S. 396–403.
- Jaeger, K. E.; Reetz, M. T. (2000): Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. In: *Curr Opin Chem Biol* 4 (1), S. 68–73.
- Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T. (1999): Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. In: *Annu. Rev. Microbiol.* 53, S. 315–351.
- Jaeger, K. E.; Eggert, T.; Eipper, A.; Reetz, M. T. (2001): Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55 (5), S. 519–530.
- Jaeger, K. E.; Eggert, T.; (2004): Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 15 (4), S. 305–313.
- Jeong, H-S; Yoo, S-K; Kim, E-J (2001): Cell surface display of salmabin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* venom on *Escherichia coli* using ice nucleation protein. In: *Enzyme Microb. Technol. (Enzyme and Microbial Technology)* 28 (2-3), S. 155–160.
- Jose, J.; Krämer, J.; Klauser, T.; Pohlner, J.; Meyer, T. F. (1996): Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. In: *Gene* 178 (1-2), S. 107–110.

- Jose, J.; Zangen, D. (2005): Autodisplay of the protease inhibitor aprotinin in *Escherichia coli*. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333 (4), S. 1218–1226.
- Jose, J.; Bernhardt, R.; Hannemann, F. (2002): Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. In: *J. Biotechnol.* 95 (3), S. 257–268.
- Jose, J.; Betscheider, D.; Zangen, D. (2005): Bacterial surface display library screening by target enzyme labeling: Identification of new human cathepsin G inhibitors. In: *Anal. Biochem.* 346 (2), S. 258–267.
- Jung, H. C.; Lebeault, J. M.; Pan, J. G. (1998a): Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. In: *Nat. Biotechnol.* 16 (6), S. 576–580.
- Jung, H. C.; Park, J. H.; Park, S. H.; Lebeault, J. M.; Pan, J. G. (1998b): Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. In: *Enzyme Microb. Technol. (Enzyme and Microbial Technology)* 22 (5), S. 348–354.
- Kato, M.; Fuchimoto, J.; Tanino, T.; Kondo, A.; Fukuda, H.; Ueda, M. (2007): Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 (3), S. 549–555.
- Kim, E. J.; Yoo, S. K. (1999): Cell surface display of hepatitis B virus surface antigen by using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. In: *Lett. Appl. Microbiol.* 29 (5), S. 292–297.
- Kim, Y. S.; Jung, H. C.; Pan, J. G. (2000): Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2), S. 788–793.
- Kjaergaard, K.; Sørensen, J. K.; Schembri, M. A.; Klemm, P. (2000): Sequestration of zinc oxide by fimbrial designer chelators. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (1), S. 10–14.
- Kjaergaard, K.; Hasman, H.; Schembri, Mark A.; Klemm, P. (2002): Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. In: *J. Bacteriol.* 184 (15), S. 4197–4204.
- Klauser, T.; Pohlner, J.; Meyer, T. F. (1990): Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. In: *EMBO J.* 9 (6), S. 1991–1999.
- Koga, Y.; Yamane, T.; Nakano, H. (2007): Creation of novel enantioselective lipases by SIMPLEX. In: *Methods Mol. Biol.* 375, S. 165–181.
- Kok, R. G.; Christoffels, V. M.; Vosman, B.; Hellingwerf, K. J. (1993): Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. In: *J. Gen. Microbiol.* 139 (10), S. 2329–2342.

- Konieczny, M. P.; Suhr, M.; Noll, A.; Autenrieth, I. B.; Alexander Schmidt, M. (2000): Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. In: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27 (4), S. 321–332.
- Kramer, U.; Rizos, K.; Apfel, H.; Autenrieth, I. B.; Lattemann, C. T. (2003): Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. In: *Infect. Immun.* 71 (4), S. 1944–1952.
- Kuchner, O.; Arnold, F. H. (1997): Directed evolution of enzyme catalysts. In: *Trends Biotechnol.* 15 (12), S. 523–530.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Lattemann, C. T.; Maurer, J.; Gerland, E.; Meyer, T. F. (2000): Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. In: *J. Bacteriol.* 182 (13), S. 3726–3733.
- Lauwereys, M.; Geus, P. de; Meutter, J. de; Stanssens P.; Matthyssens, G. (1991). Lipases: Structure Function and Genetic Engineering. In: *VCH, Weinheim*, S. 243–251.
- Lazdunski, A.; Filloux, A.; Michel, G.; Foglino, M.; Murgier, M.; Latifi, A.; Chapon, V.; Blèves, S.; Bally, M. (1996): general secretion pathway in *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular mechanisms and regulation. In *Molecular Biology of Pseudomonads*. Edited by T. Nakazawa. In: *Washington DC ASM Press*, S. 427–437.
- Leary, J. J.; Brigati, D. J.; Ward, D. C. (1983): Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 (13), S. 4045–4049.
- Lee, J. S.; Shin, K. S.; Pan, J. G.; Kim, C. J. (2000): Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. In: *Nat. Biotechnol.* 18 (6), S. 645–648.
- Lee, S. Y.; Choi, J. H.; Xu, Z. (2003): Microbial cell-surface display. In: *Trends Biotechnol.* 21 (1), S. 45–52.
- Lesuisse, E.; Schanck, K.; Colson, C. (1993): Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. In: *Eur. J. Biochem.* 216 (1), S. 155–160.
- Li, L.; Kang, D. G.; Cha, H. J. (2004): Functional display of foreign protein on surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein. In: *Biotechnol. Bioeng.* 85 (2), S. 214–221.
- Liébecq, C. (1992): Biochemical nomenclature and related documents. A compendium. 2. Ed. Hg. v. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. London [u.a.]: Portland Press.
- Liebeton, K.; Zonta, A.; Schimossek, K.; Nardini, M.; Lang, D.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T.; Jaeger, K. E. (2000): Directed evolution of an enantioselective lipase. In: *Chem. Biol.* 7 (9), S. 709–718.



- Lipovsek, D.; Antipov, E.; Armstrong, K. A.; Olsen, M. J.; Klivanov, A. M.; Tidor, B.; Wittrup, K. D. (2007): Selection of horseradish peroxidase variants with enhanced enantioselectivity by yeast surface display. In: *Chem. Biol.* 14 (10), S. 1176–1185.
- Liu, W.; Zhao, H.; Jia, B.; Xu, L.; Yan, Y. (2010): Surface display of active lipase in *Saccharomyces cerevisiae* using Cwp2 as an anchor protein. In: *Biotechnol. Lett.* 32 (2), S. 255–260.
- Longhi, S.; Cambillau, C. (1999): Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1441 (2-3), S. 185–196.
- Malcata, F. X. (Hg.) (1996): Engineering of/with Lipases: Proceedings of the NATO Advanced Study Institute, Povoá de Varzim, Portugal, May 22-June 2, 1995: Kluwer Academic Publishers Group.
- Martineau, P.; Charbit, A.; Leclerc, C.; Werts, C.; O'Callaghan, D.; Hofnung, M. (1991): A genetic system to elicit and monitor antipeptide antibodies without peptide synthesis. In: *Biotechnology (N.Y.)* 9 (2), S. 170–172.
- Martinez, C.; Geus, P. de; Lauwereys, M.; Matthysens, G.; Cambillau, C. (1992): *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. In: *Nature* 356 (6370), S. 615–618.
- Maurer, J.; Jose, J.; Meyer, T. F. (1997): Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. In: *J. Bacteriol.* 179 (3), S. 794–804.
- McCarter, J. D.; Stephens, D.; Shoemaker, K.; Rosenberg, S.; Kirsch, J. F.; Georgiou, G. (2004): Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. In: *J. Bacteriol.* 186 (17), S. 5919–5925.
- Müller, D.; Benz, I.; Tapadar, D.; Buddenborg, C.; Greune, L.; Schmidt, M. A. (2005): Arrangement of the translocator of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence on the bacterial surface. In: *Infect. Immun.* 73 (7), S. 3851–3859.
- Nardini, M.; Lang, D. A.; Liebeton, K.; Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W. (2000): Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. In: *J. Biol. Chem.* 275 (40), S. 31219–31225.
- Ni, X.; Yue, L.; Li, J.; Chi, Z.; Liu, Z.; Madzak, C. (2009): Properties of alkaline protease genetically engineered on cell surface of the yeast *Yarrowia lipolytica*. In: *Indian J. Biochem. Biophys.* 46 (4), S. 294–298.
- Nthangeni, M. B.; Patterson, H-G; van Tonder, A.; Vergeer, W. P.; Litthauer, D. (2001): Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. In: *Enzyme Microb. Technol. (Enzyme and Microbial Technology)* 28 (7-8), S. 705–712.

- Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Harel, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J. (1992): The alpha/beta hydrolase fold. In: *Protein Eng.* 5 (3), S. 197–211.
- Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. (1995): How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. In: *Protein Sci.* 4 (11), S. 2411–2423.
- Pauwels, K.; Lustig, A.; Wyns, L.; Tommassen, J.; Savvides, S. N.; van Gelder, P. (2006): Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 (4), S. 374–375.
- Peters, G. H.; Toxvaerd, S.; Andersen, K. V.; Svendsen, A. (1999): Analysis of the dynamics of *rhizomucor miehei* lipase at different temperatures. In: *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16 (5), S. 1003–1018.
- Peters, G. H.; van Aalten, D. M.; Svendsen, A.; Bywater, R. (1997): Essential dynamics of lipase binding sites: the effect of inhibitors of different chain length. In: *Protein Eng.* 10 (2), S. 149–158.
- Quyen, D. T.; Schmidt-Dannert, C.; Schmid, R. D. (1999): High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2), S. 787–794.
- Rajakumara, E.; Acharya, P.; Ahmad, S.; Sankaranaryanan, R.; Rao, N. M. (2008): Structural basis for the remarkable stability of *Bacillus subtilis* lipase (Lip A) at low pH. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1784 (2), S. 302–311.
- Rajakumara, E.; Acharya, P.; Ahmad, S.; Shanmugam, V. M.; Rao, N. M.; Sankaranarayanan, R. (2004): Crystallization and preliminary X-ray crystallographic investigations on several thermostable forms of a *Bacillus subtilis* lipase. In: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60 (Pt 1), S. 160–162.
- Rakestraw, J. A.; Aird, D.; Aha, P. M.; Baynes, B. M.; Lipovsek, D. (2011): Secretion-and-capture cell-surface display for selection of target-binding proteins. In: *Protein Eng. Des. Sel.* 24 (6), S. 525–530.
- Reetz, M. T.; Bocola, M.; Carballeira, J. Daniel; Zha, D.; Vogel, A. (2005): Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: combinatorial active-site saturation test. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44 (27), S. 4192–4196.
- Reetz, M. T.; Carballeira, J. D.; Peyralans, J.; Höbenreich, H.; Maichele, A.; Vogel, A. (2006): Expanding the substrate scope of enzymes: combining mutations obtained by CASTing. In: *Chemistry* 12 (23), S. 6031–6038.
- Reetz, M. T.; Höbenreich, H.; Soni, P.; Fernández, L. (2008): A genetic selection system for evolving enantioselectivity of enzymes. In: *Chem. Commun. (Camb.)* (43), S. 5502–5504.

- Reetz, M. T.; Puls, M.; Carballeira, J. D.; Vogel, A.; Jaeger, K. E.; Eggert, T. Thiel, W.; Bocola, M.; Otte, N. (2007): Learning from directed evolution: Further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity. In: *Chembiochem* 8 (1), S. 106–112.
- Richins, R. D.; Kaneva, I.; Mulchandani, A.; Chen, W. (1997): Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. In: *Nat. Biotechnol.* 15 (10), S. 984–987.
- Rizos, K.; Lattemann, C. T.; Bumann, D.; Meyer, T. F.; Aebischer, T. (2003): Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. In: *Infect. Immun.* 71 (11), S. 6320–6328.
- Rosenau F. (2001): Überexpression der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* und physiologische Charakterisierung der Foldasefunktion. Universität, Düsseldorf
- Rosenau, F.; Tommassen, J.; Jaeger, K. E. (2004): Lipase-specific foldases. In: *Chembiochem* 5 (2), S. 152–161.
- Ruiz-Pérez, F.; León-Kempis, R.; Santiago-Machuca, A.; Ortega-Pierres, G.; Barry, E.; Levine, M.; González-Bonilla, C. (2002): Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. In: *Infect. Immun.* 70 (7), S. 3611–3620.
- Rutherford, N.; Mourez, M. (2006): Surface display of proteins by gram-negative bacterial autotransporters. In: *Microb. Cell Fact.* 5, S. 22.
- Rutherford, N.; Charbonneau, M. E.; Berthiaume, F.; Betton, J. M.; Mourez, M. (2006): The periplasmic folding of a cysteineless autotransporter passenger domain interferes with its outer membrane translocation. In: *J. Bacteriol.* 188 (11), S. 4111–4116.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shi; Wen Su W (2001): Display of green fluorescent protein on *Escherichia coli* cell surface. In: *Enzyme Microb. Technol. (Enzyme and Microbial Technology)* 28 (1), S. 25–34.
- Shibata, H.; Kato, H.; Oda, J. (1998): Calcium ion-dependent reactivation of a *Pseudomonas* lipase by its specific modulating protein, LipB. In: *J. Biochem.* 123 (1), S. 136–141.
- Shimada, K.; Ohnishi, Y.; Horinouchi, S.; Beppu, T. (1994): Extracellular transport of pseudoazurin of *Alcaligenes faecalis* in *Escherichia coli* using the COOH-terminal domain of *Serratia marcescens* serine protease. In: *J. Biochem.* 116 (2), S. 327–334.

- Skillman, K. M.; Barnard, T. J.; Peterson, J. H.; Ghirlando, R.; Bernstein, H. D. (2005): Efficient secretion of a folded protein domain by a monomeric bacterial autotransporter. In: *Mol. Microbiol.* 58 (4), S. 945–958.
- Stentebjerg-Olesen, B.; Pallesen, L.; Jensen, L. B.; Christiansen, G.; Klemm, P. (1997): Authentic display of a cholera toxin epitope by chimeric type 1 fimbriae: effects of insert position and host background. In: *Microbiology (Reading, Engl.)* 143 (Pt 6), S. 2027–2038.
- Studier, F. W.; Moffatt, B. A. (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. In: *J. Mol. Biol.* 189 (1), S. 113–130.
- Su, G. D.; Huang, D. F.; Han, S. Y.; Zheng, S. P.; Lin, Y. (2009): Display of *Candida antarctica* lipase B on *Pichia pastoris* and its application to flavor ester synthesis. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Suzuki, T.; Lett, M. C.; Sasakawa, C. (1995): Extracellular transport of VirG protein in *Shigella*. In: *J. Biol. Chem.* 270 (52), S. 30874–30880.
- Swanson, J.; Mayer, L. W.; Tam, M. R. (1982): Antigenicity of *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane protein(s) III detected by immunoprecipitation and Western blot transfer with a monoclonal antibody. In: *Infect. Immun.* 38 (2), S. 668–672.
- Tanino, T.; Fukuda, H.; Kondo, A. (2006): Construction of a *Pichia pastoris* cell-surface display system using Flo1p anchor system. In: *Biotechnol. Prog.* 22 (4), S. 989–993.
- Tomassen, J.; Filloux, A.; Bally, M.; Murgier, M.; Lazdunski, A. (1992): Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *FEMS Microbiol. Rev.* 9 (1), S. 73–90.
- Urban, A.; Leipelt, M.; Eggert, T.; Jaeger, K. E. (2001): DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *J. Bacteriol.* 183 (2), S. 587–596.
- Valls, M.; Atrian, S.; Lorenzo, V. de; Fernández, L. A. (2000): Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. In: *Nat. Biotechnol.* 18 (6), S. 661–665.
- van den Berg, Bert (2010): Crystal structure of a full-length autotransporter. In: *J. Mol. Biol.* 396 (3), S. 627–633.
- van Pouderoyen, G.; Eggert, T.; Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W. (2001): The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. In: *J. Mol. Biol.* 309 (1), S. 215–226.
- Veiga, E.; Lorenzo, V. de; Fernández, L. A. (1999): Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. In: *Mol. Microbiol.* 33 (6), S. 1232–1243.
- Veiga, E.; de Lorenzo, V.; Fernández, L. A. (2003a): Autotransporters as scaffolds for novel bacterial adhesins: surface properties of *Escherichia coli* cells displaying Jun/Fos dimerization domains. In: *J. Bacteriol.* 185 (18), S. 5585–5590.

- Veiga, E.; de Lorenzo, V.; Fernández, L. A. (2003b): Neutralization of enteric coronaviruses with *Escherichia coli* cells expressing single-chain Fv-autotransporter fusions. In: *J. Virol.* 77 (24), S. 13396–13398.
- Wentzel, A.; Christmann, A.; Adams, T.; Kolmar, H. (2001): Display of passenger proteins on the surface of *Escherichia coli* K-12 by the enterohemorrhagic *E. coli* intimin EaeA. In: *J. Bacteriol.* 183 (24), S. 7273–7284.
- Wentzel, A.; Christmann, A.; Krätzner, R.; Kolmar, H. (1999): Sequence requirements of the GPNG beta-turn of the *Ecballium elaterium* trypsin inhibitor II explored by combinatorial library screening. In: *J. Biol. Chem.* 274 (30), S. 21037–21043.
- Wilhelm, S.; Gdynia, A.; Tielen, P.; Rosenau, F.; Jaeger, K. E. (2007a): The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. In: *J. Bacteriol.* 189 (18), S. 6695–6703.
- Wilhelm, S.; Rosenau, F.; Becker, S.; Buest, S.; Hausmann, S.; Kolmar, H.; Jaeger, K. E. (2007b): Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. In: *Chembiochem* 8 (1), S. 55–60.
- Wittrup, K. D. (2001): Protein engineering by cell-surface display. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (4), S. 395–399.
- Xu, Y.; Liu, Q.; Zhou, L.; Yang, Z.; Zhang, Y. (2008): Surface display of GFP by *Pseudomonas syringae* truncated ice nucleation protein in attenuated *Vibrio anguillarum* strain. In: *Mar. Biotechnol.* 10 (6), S. 701–708.
- Yang, C.; Cai, N.; Dong, M.; Jiang, H.; Li, J.; Qiao, C.; Mulchandani, A.; Chen, W. (2008a): Surface display of MPH on *Pseudomonas putida* JS444 using ice nucleation protein and its application in detoxification of organophosphates. In: *Biotechnol. Bioeng.* 99 (1), S. 30–37.
- Yang, Guangyu; Withers, Stephen G. (2009): Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution. In: *Chembiochem* 10 (17), S. 2704–2715.
- Yang, T. H.; Kwon, M. A.; Song, J. K.; Pan, J. G.; Rhee, J. S. (2010): Functional display of *Pseudomonas* and *Burkholderia* lipases using a translocator domain of EstA autotransporter on the cell surface of *Escherichia coli*. In: *Journal of biotechnology* 146 (3), S. 126–129.
- Yang, T. H.; Pan, J. G.; Seo, Y. S.; Rhee, J. S. (2004): Use of *Pseudomonas putida* EstA as an anchoring motif for display of a periplasmic enzyme on the surface of *Escherichia coli*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (12), S. 6968–6976.

- Yang, Z.; Liu, Q.; Wang, Q.; Zhang, Y. (2008b): Novel bacterial surface display systems based on outer membrane anchoring elements from the marine bacterium *Vibrio anguillarum*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (14), S. 4359–4365.
- Zehr, B. D.; Savin, T. J.; Hall, R. E. (1989): A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. In: *Anal. Biochem.* 182 (1), S. 157–159.
- Zhao, H.; Shen, Z. M.; Kahn, P. C.; Lipke, P. N. (2001): Interaction of alpha-agglutinin and a-agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* sexual cell adhesion molecules. In: *J. Bacteriol.* 183 (9), S. 2874–2880.
- Zhu, C.; Ruiz-Perez, F.; Yang, Z.; Mao, Y.; Hackethal, V. L.; Greco, K. M.; Choy, W.; Davis, K.; Butters, J. R.; Boedeker, E. C.. (2006): Delivery of heterologous protein antigens via hemolysin or autotransporter systems by an attenuated ler mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*. In: *Vaccine* 24 (18), S. 3821–3831.

## 6 Anhang

### 6.1 Übersicht der randomisierten Positionen bei der Cutinase CAST-Bibliotheken

#### 6.1.1 Übersicht der randomisierten Positionen in der Nukleotidsequenz

	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	10 20 30 40 50
Cutinase wt	ATGCTGCCTA CTTCTAACCC TGCCCAGGAG CTTGAGGCGC GCCAGCTTGG
Cutinase BibA	ATGCTGCCTA CTTCTAACCC TGCCCAGGAG CTTGAGGCGC GCCAGCTTGG
Cutinase BibB	ATGCTGCCTA CTTCTAACCC TGCCCAGGAG CTTGAGGCGC GCCAGCTTGG
Cutinase BibC	ATGCTGCCTA CTTCTAACCC TGCCCAGGAG CTTGAGGCGC GCCAGCTTGG
Cutinase BibD	ATGCTGCCTA CTTCTAACCC TGCCCAGGAG CTTGAGGCGC GCCAGCTTGG
Cutinase BibE	ATGCTGCCTA CTTCTAACCC TGCCCAGGAG CTTGAGGCGC GCCAGCTTGG
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	60 70 80 90 100
Cutinase wt	TAGAACAACCT CGCGACGATC TGATCAACGG CAATAGCGCT TCCTGCCGCG
Cutinase BibA	TAGAACAACCT CGCGACGATC TGATCAACGG CAATAGCGCT TCCTGCCGCG
Cutinase BibB	TAGAACAACCT CGCGACGATC TGATCAACGG CAATAGCGCT TCCTGCCGCG
Cutinase BibC	TAGAACAACCT CGCGACGATC TGATCAACGG CAATAGCGCT TCCTGCCGCG
Cutinase BibD	TAGAACAACCT CGCGACGATC TGATCAACGG CAATAGCGCT TCCTGCCGCG
Cutinase BibE	TAGAACAACCT CGCGACGATC TGATCAACGG CAATAGCGCT TCCTGCCGCG
	.... ....  .... ....  <b>AvaI</b>  ....  .... ....  .... ....
	110 120 130 140 150
Cutinase wt	ATGTCATCTT CATTTATGCC CGAGGTTCAA CAGAGACGGG CAACTTGGGA
Cutinase BibA	ATGTCATCTT CATTTATGCC CGTGGTNNKA CANNKACGGG CAACTTGGGA
Cutinase BibB	ATGTCATCTT CATTTATGCC CGAGGTTCAA CAGAGACGGG CAACTTGGGA
Cutinase BibC	ATGTCATCTT CATTTATGCC CGAGGTTCAA CAGAGACGGG CAACTTGGGA
Cutinase BibD	ATGTCATCTT CATTTATGCC CGAGGTTCAA CAGAGACGGG CAACTTGGGA
Cutinase BibE	ATGTCATCTT CATTTATGCC CGAGGTTCAA CAGAGACGGG CAACTTGGGA
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	160 170 180 190 200
Cutinase wt	ACTCTCGGTC CTAGCATTGC CTCCAACCTT GAGTCCGCCT TCGGCAAGGA
Cutinase BibA	NNKCTCGGTC CTAGCATTGC CTCCAACCTT GAGTCCGCCT TCGGCAAGGA
Cutinase BibB	ACTCTCGGTC CTAGCATTGC CTCCAACCTT GAGTCCGCCT TCGGCAAGGA
Cutinase BibC	ACTCTCGGTC CTAGCATTGC CTCCAACCTT GAGTCCGCCT TCGGCAAGGA
Cutinase BibD	ACTCTCGGTC CTAGCATTGC CTCCAACCTT GAGTCCGCCT TCGGCAAGGA
Cutinase BibE	ACTCTCGGTC CTAGCATTGC CTCCAACCTT GAGTCCGCCT TCGGCAAGGA
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	210 220 230 240 250
Cutinase wt	CGGTGTCTGG ATTCAGGGCG TTGGCGGTGC CTACCGAGCC ACTCTTGGAG
Cutinase BibA	CGGTGTCTGG ATTCAGGGCG TTGGCGGTGC CTACCGAGCC ACTCTTGGAG
Cutinase BibB	CGGTGTCTGG ATTCAGGGCG TTGGCGGTGC CTACCGAGCC ACTNNKGGAG
Cutinase BibC	CGGTGTCTGG ATTCAGGGCG TTGGCGGTGC CTACCGAGCC ACTCTTGGAG
Cutinase BibD	CGGTGTCTGG ATTCAGGGCG TTGGCGGTGC CTACCGAGCC ACTCTTGGAG
Cutinase BibE	CGGTGTCTGG ATTCAGGGCG TTGGCGGTGC CTACCGAGCC ACTCTTGGAG
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	260 270 280 290 300
Cutinase wt	ACAATGCTCT CCCTCGCGGA ACCTCTAGCG CCGCAATCAG GGAGATGCTC
Cutinase BibA	ACAATGCTCT CCCTCGCGGA ACCTCTAGCG CCGCAATCAG GGAGATGCTC
Cutinase BibB	ACNNKGCTCT CCCTCGCGGA ACCTCTAGCG CCGCAATCAG GGAGATGCTC
Cutinase BibC	ACAATGCTCT CCCTCGCGGA ACCTCTAGCG CCGCAATCAG GGAGATGCTC
Cutinase BibD	ACAATGCTCT CCCTCGCGGA ACCTCTAGCG CCGCAATCAG GGAGATGCTC
Cutinase BibE	ACAATGCTCT CCCTCGCGGA ACCTCTAGCG CCGCAATCAG GGAGATGCTC

	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	310 320 330 340 350
Cutinase wt	GGTCTCTTCC AGCAGGCCAA CACCAAGTGC CCTGACGCGA CTTTGATCGC
Cutinase BibA	GGTCTCTTCC AGCAGGCCAA CACCAAGTGC CCTGACGCGA CTTTGATCGC
Cutinase BibB	GGTCTCTTCC AGCAGGCCAA CACCAAGTGC CCTGACGCGA CTTTGATCGC
Cutinase BibC	GGTCTCTTCC AGCAGGCCAA CACCAAGTGC CCTGACGCGA CTTTGATCGC
Cutinase BibD	GGTCTCTTCC AGCAGGCCAA CACCAAGTGC CCTGACGCGA CTTTGATCGC
Cutinase BibE	GGTCTCTTCC AGCAGGCCAA CACCAAGTGC CCTGACGCGA CTTTGATCGC
	<b>NaeI</b> .... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	360 370 380 390 400
Cutinase wt	CGGTGGCTAC AGCCAGGGTG CTGCACTTGC AGCCGCCTCC ATCGAGGACC
Cutinase BibA	CGGTGGCTAC AGCCAGGGTG CTGCACTTGC AGCCGCCTCC ATCGAGGACC
Cutinase BibB	CGGTGGCTAC AGCCAGGGTG CTGCACTTGC AGCCGCCTCC ATCGAGGACC
Cutinase BibC	CGGCGGCNNK AGCNNKGGTG CTGCACTTGC AGCCGCCTCC ATCGAGGACC
Cutinase BibD	CGGTGGCTAC AGCCAGGGTG CTGCACTTGC AGCCGCCTCC ATCGAGGACC
Cutinase BibE	CGGTGGCTAC AGCCAGGGTG CTGCACTTGC AGCCGCCTCC ATCGAGGACC
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	410 420 430 440 450
Cutinase wt	TCGACTCGGC CATTCGTGAC AAGATCGCCG GAACTGTTCT GTTCGGCTAC
Cutinase BibA	TCGACTCGGC CATTCGTGAC AAGATCGCCG GAACTGTTCT GTTCGGCTAC
Cutinase BibB	TCGACTCGGC CATTCGTGAC AAGATCGCCG GAACTGTTCT GTTCGGCTAC
Cutinase BibC	TCGACTCGGC CATTCGTGAC AAGATCGCCG GAACTGTTCT GTTCGGCTAC
Cutinase BibD	TCGACTCGGC CATTCGTGAC AAGATCGCCG GAACTGTTCT GTTCGGCTAC
Cutinase BibE	TCGACTCGGC CATTCGTGAC AAGATCGCCG GAACTGTTCT GTTCGGCTAC
	.... ....  <b>PstI</b> .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	460 470 480 490 500
Cutinase wt	ACCAAGAACC TACAGAACCG TGGCCGAATC CCCAACTACC CTGCCGACAG
Cutinase BibA	ACCAAGAACC TACAGAACCG TGGCCGAATC CCCAACTACC CTGCCGACAG
Cutinase BibB	ACCAAGAACC TACAGAACCG TGGCCGAATC CCCAACTACC CTGCCGACAG
Cutinase BibC	ACCAAGAACC TACAGAACCG TGGCCGAATC CCCAACTACC CTGCCGACAG
Cutinase BibD	NNKAAGAACC TGCAGAACCG TGGCCGAATC CCCAACTACC CTGCCGACAG
Cutinase BibE	ACCAAGAACC TACAGAACCG TGGCCGAATC CCCAACTACC CTGCCGACAG
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  <b>AgeI</b> .... ....
	510 520 530 540 550
Cutinase wt	GACCAAGGTC TTCTGCAATA CAGGGGATCT CGTTTGTACT GGTAGCTTGA
Cutinase BibA	GACCAAGGTC TTCTGCAATA CAGGGGATCT CGTTTGTACT GGTAGCTTGA
Cutinase BibB	GACCAAGGTC TTCTGCAATA CAGGGGATCT CGTTTGTACT GGTAGCTTGA
Cutinase BibC	GACCAAGGTC TTCTGCAATA CAGGGGATCT CGTTTGTACT GGTAGCTTGA
Cutinase BibD	GACCAAGGTC TTCTGCAATA CAGGGGATCT CGTTTGTACT GGTAGCTTGA
Cutinase BibE	GACCAAGGTC TTCTGCAATA CAGGGGATCT <b>CNNKTGTACC</b> <b>GGTAGC</b> <b>NNKA</b>
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	560 570 580 590 600
Cutinase wt	TCGTTGCTGC ACCTCACTTG GCTTATGGTC CTGATGCTCG TGGCCCTGCC
Cutinase BibA	TCGTTGCTGC ACCTCACTTG GCTTATGGTC CTGATGCTCG TGGCCCTGCC
Cutinase BibB	TCGTTGCTGC ACCTCACTTG GCTTATGGTC CTGATGCTCG TGGCCCTGCC
Cutinase BibC	TCGTTGCTGC ACCTCACTTG GCTTATGGTC CTGATGCTCG TGGCCCTGCC
Cutinase BibD	TCGTTGCTGC ACCTCACTTG GCTTATGGTC CTGATGCTCG TGGCCCTGCC
Cutinase BibE	<b>TCNNKGCTGC</b> ACCTCACTTG GCTTATGGTC CTGATGCTCG TGGCCCTGCC
	.... ....  .... ....  .... ....  .... ....  .... ....
	610 620 630 640
Cutinase wt	CCTGAGTTCC TCATCGAGAA GGTCGGGGCT GTCCGTGGTT CTGCT
Cutinase BibA	CCTGAGTTCC TCATCGAGAA GGTCGGGGCT GTCCGTGGTT CTGCT
Cutinase BibB	CCTGAGTTCC TCATCGAGAA GGTCGGGGCT GTCCGTGGTT CTGCT
Cutinase BibC	CCTGAGTTCC TCATCGAGAA GGTCGGGGCT GTCCGTGGTT CTGCT
Cutinase BibD	CCTGAGTTCC TCATCGAGAA GGTCGGGGCT GTCCGTGGTT CTGCT
Cutinase BibE	CCTGAGTTCC TCATCGAGAA GGTCGGGGCT GTCCGTGGTT CTGCT



## 6.1.2 Proteinsequenzen

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            10      20      30      40      50
Cutinase wt      MLPTSNPAQE LEARQLGRTT RDDLINGNSA SCRDVIFIYA RGSTETGNLG
Cutinase BibA    MLPTSNPAQE LEARQLGRTT RDDLINGNSA SCRDVIFIYA RGXTETGNLG
Cutinase BibB    MLPTSNPAQE LEARQLGRTT RDDLINGNSA SCRDVIFIYA RGSTETGNLG
Cutinase BibC    MLPTSNPAQE LEARQLGRTT RDDLINGNSA SCRDVIFIYA RGSTETGNLG
Cutinase BibD    MLPTSNPAQE LEARQLGRTT RDDLINGNSA SCRDVIFIYA RGSTETGNLG
Cutinase BibE    MLPTSNPAQE LEARQLGRTT RDDLINGNSA SCRDVIFIYA RGSTETGNLG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            60      70      80      90     100
Cutinase wt      TLGPSIASNL ESAFGKDGWV IQGVGGAYRA TLGDNALPRG TSSAAIREML
Cutinase BibA    XLGPSIASNL ESAFGKDGWV IQGVGGAYRA TLGDNALPRG TSSAAIREML
Cutinase BibB    TLGPSIASNL ESAFGKDGWV IQGVGGAYRA TXGDXALPRG TSSAAIREML
Cutinase BibC    TLGPSIASNL ESAFGKDGWV IQGVGGAYRA TLGDNALPRG TSSAAIREML
Cutinase BibD    TLGPSIASNL ESAFGKDGWV IQGVGGAYRA TLGDNALPRG TSSAAIREML
Cutinase BibE    TLGPSIASNL ESAFGKDGWV IQGVGGAYRA TLGDNALPRG TSSAAIREML

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            110     120     130     140     150
Cutinase wt      GLFQQANTKC PDATLIAGGY SQGAALAAAS IEDLDSAIRD KIAGTVLFGY
Cutinase BibA    GLFQQANTKC PDATLIAGGY SQGAALAAAS IEDLDSAIRD KIAGTVLFGY
Cutinase BibB    GLFQQANTKC PDATLIAGGY SQGAALAAAS IEDLDSAIRD KIAGTVLFGY
Cutinase BibC    GLFQQANTKC PDATLIAGGX SXGAALAAAS IEDLDSAIRD KIAGTVLFGY
Cutinase BibD    GLFQQANTKC PDATLIAGGY SQGAALAAAS IEDLDSAIRD KIAGTVLFGY
Cutinase BibE    GLFQQANTKC PDATLIAGGY SQGAALAAAS IEDLDSAIRD KIAGTVLFGY

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
            160     170     180     190     200
Cutinase wt      TKNLQNRGRI PNYPADRTKV FCNTGDLVCT GSLIVAAPHL AYGPDARGPA
Cutinase BibA    TKNLQNRGRI PNYPADRTKV FCNTGDLVCT GSLIVAAPHL AYGPDARGPA
Cutinase BibB    TKNLQNRGRI PNYPADRTKV FCNTGDLVCT GSLIVAAPHL AYGPDARGPA
Cutinase BibC    TKNLQNRGRI PNYPADRTKV FCNTGDLVCT GSLIVAAPHL AYGPDARGPA
Cutinase BibD    XKNLQNRGRI PNYPADRTKV FCNTGDLVCT GSLIVAAPHL AYGPDARGPA
Cutinase BibE    TKNLQNRGRI PNYPADRTKV FCNTGDLXCT GSXIXAAPHL AYGPDARGPA

```

```

      ....|....| ....|
            210
Cutinase wt      PEFLIEKVRA VRGSA
Cutinase BibA    PEFLIEKVRA VRGSA
Cutinase BibB    PEFLIEKVRA VRGSA
Cutinase BibC    PEFLIEKVRA VRGSA
Cutinase BibD    PEFLIEKVRA VRGSA
Cutinase BibE    PEFLIEKVRA VRGSA

```

## 6.2 Übersicht FACS-basierter Hochdurchsatzverfahren auf *E. coli*

**Tabelle 15: FACS-basierte Hochdurchsatzverfahren zur Identifikation von veränderten Enzymvarianten (modifiziert nach Yang und Withers 2009)**

	Ziel (Organismus)	Strategien	Evolutiv veränderte Funktion
Oberflächendisplay	Substratspezifität der membranständigen Protease OmpT ( <i>E. coli</i> )	1.) Substrat kann über elektrostatische Wechselwirkungen an die Zelle binden; nach Spaltung (Abspaltung des Quenchers) kommt es zur Fluoreszenz  2.) Das fluoreszierende Produkt kann an der Zelle binden (elektrostatische Wechselwirkung)	Veränderte Erkennungssequenzen für die Spaltung, unter anderem mit unnatürlichen Aminosäuren
	Enantioselektivität der Meerrettich Peroxidase ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100)	Kovalente Bindung des Produkts über Tyramid Signalamplifikation	Varianten mit veränderter Enantioselektivität konnten gefunden werden
	Enantioselektivität der membranständigen Esterase A ( <i>E. coli</i> )	Kovalente Bindung des Produkts über Tyramid Signalamplifikation (ESCAPED)	Varianten mit veränderter Enantioselektivität konnten gefunden werden
	Esterase-Aktivität eines heterodimeren Fab-Antikörpers ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MT8-1)	Bindung eines fluoreszierenden Intermediats des Übergangszustands	Zwei Varianten mit moderater Aktivität konnten gefunden werden
GFP-basierte Screening Methoden	Faltungseffizienz des Chaperons GroEL/S	GFP wird als Substrat der Faltung verwendet	Varianten mit höherer Effizienz bezüglich der Faltung, konnten selektiert werden
	Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase	Aktivität wird durch die Expression von GFP nachgewiesen	Selektive Rekombinase konnte gefunden werden
	Substratspezifität von aminoacyl-tRNA Synthetase	Aktivität wird durch die Expression von GFP nachgewiesen	Drei Varianten für den Einbau unnatürlicher Aminosäuren konnten selektiert werden
	Aktivität und pH-Optimum von Hydrolasen	pH-sensitive Variante von GFP wird zum Nachweis des durch die Hydrolase veränderten pH-Werts verwendet	Modell-System

	Ziel (Organismus)	Strategien	Evolvierte Funktion
Nachweis des Produkts in der Zelle	Aktivität einer Carboxyl-Esterase (Protoblasten von <i>Arabidopsis thaliana</i> )	Inhibition der endogenen Esterasen und fluoreszierendes Substrat	Modell-System
	Aktivität von Glycosyltransferase ( <i>E. coli</i> )	Fluoreszierendes Produkt, welches nicht aus der Zelle diffundieren kann	Variante mit erhöhter Aktivität konnte selektiert werden
	Splicing-Aktivität eines Ribozyms	Gekoppelter Enzymtest in der Zelle mit $\beta$ -Lactamase	Variante mit erhöhter Aktivität konnte selektiert werden
	Aktivität von Ferrochelataase	Produkt führt zu einem vermehrten Fluoreszenzsignal	Variante mit erhöhter Aktivität konnte selektiert werden
	Aktivität der $\beta$ -Lactamase	Lipophiles Produkt kann nicht aus der Zelle diffundieren	Modell-System
	Aktivität eines Aldolase Antikörpers	Produkt kann nicht aus der Zelle diffundieren, da es mit Nukleophilen in der Zelle reagiert	Modell-System
	Erhöhte Nukleosidkinase Aktivität	Fluoreszierende Thymidine werden als Substrat verwendet	Variante mit erhöhter Aktivität

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten ein- und dreibuchstabigen Abkürzungen für Aminosäuren sowie alle verwendeten physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry* (Liébecq 1992).

(R)	(R)-Konfiguration
(S)	(S)-Konfiguration
2-MDA	2-Methyldekansäure
A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Amp	Ampicillin
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
AS	<u>A</u> minosäure
Asp	Asparaginsäure
bp	<u>B</u> asenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CAL B	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
dATP	3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	3'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat

DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
Dsb	<i>Disulfide bond formation</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dYT	<i>double Yeast Tryptone</i>
E	Enantioselektivität
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee	<i>enantiomeric excess</i> (Enantiomerenüberschuss, Maß für das Enantiomerenverhältnis in einer Mischung zweier Enantiomere in %)
epPCR	<i>error-prone-polymerase chain reaction</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflußzytometer ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FITC	Fluorescein isothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde(n)
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> )

IMAC	immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
<i>lac</i>	zum <i>E. coli</i> Laktose-Operon gehörend (z.B. <i>lac</i> -Repressor, <i>lac</i> P/O)
LB	Luria Bertani-Medium
M	Molar [mol/l]
mA	Milliampère
min	Minute(n), minütig
ml	Milliliter
MWCO-Wert	( <i>molecular weight cut off</i> ) Ausschlussgröße nach molekularer Masse
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
<i>p</i>	para
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polmerasekettenreaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
Pro	Prolin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SOE-PCR	Splicing by Overlapping Extension - PCR

T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitolmonolaurat
U	Enzymeinheiten
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
$\lambda$	Wellenlänge

## 6.4 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und der Möglichkeit, in seiner Abteilung diese Arbeit anzufertigen. Vielen Dank für die interessanten Diskussionen.

Frau Prof. Dr. Felicitas Pfeifer danke ich für die Übernahme des Korreferats und die nette Aufnahme in ihr Forschungsseminar im Rahmen des Promotionkolleges.

Prof. Dr. Karl-Erich Jäger vom Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Forschungszentrum Jülich) und Prof. Dr. Dr. h.c. Reetz vom Max Planck Institut für Kohlenforschung (Mülheim/Ruhr) danke ich für die nette Kooperation. Mein besonderer Dank gilt hier Susanne Wilhelm, Frank Rosenau, Sabrina Schell, Sascha Hausmann und Horst Höbenreich.

Bei Dr. Stefan Becker möchte ich mich ganz herzlich für die nette Einführung in die Welt der leuchtenden Zellen bedanken.

Bei Dr. Marco Bocola möchte ich mich ganz herzlich für das Erstellen der CAST-Positionen bedanken und für die nette Einführung in das rationelle Proteindesign.

Barbara Koch möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung am Mikroskop danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe Kolmar möchte ich für die nette Zeit innerhalb und außerhalb des Labors danken. Insbesondere danke ich Michael, Fanny, Silke, Barbara, Janine, Maren, Gernot, Simone, Matin, Verena, Olga und Andreas.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die große Unterstützung und das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben. Danke, dass Ihr nie den Glauben an diese Arbeit verloren habt.

Bei Oliver möchte ich mich ganz besonders für den Rückhalt und für die beste Unterstützung, die man sich wünschen kann, bedanken.

.



## 6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten	Stefanie Heil geboren am 27.12.1980 in Dieburg Staatsangehörigkeit: deutsch
Dez. 2006 – Okt. 2012	Promotion im Bereich Biochemie an der Technischen Universität Darmstadt im Rahmen des DFG Sonderschwerpunktes 1170 "Directed Evolution to Optimize and Understand Molecular Biocatalysis" Titel der Dissertation: „Evolutive Optimierung mikrobieller Lipasen und Esterasen in Hinblick auf Substratspezifität und Enantioselektivität“
Okt. 2000 – Sep. 2006	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt mit den Schwerpunktfächern: Mikrobiologie Biochemie Zell- und Entwicklungsbiologie Diplomarbeit im Bereich Mikrobiologie an der Technischen Universität Darmstadt <u>Titel der Diplomarbeit:</u> „Biochemische Untersuchungen der Acetophenon Carboxylase einem Schlüsselenzym des anaeroben Ethylbenzol-Abbaus“
Mai 2000	Abitur an der Landrat-Gruber-Schule in Dieburg

---

Stefanie Heil

## 6.6 Eidesstattliche Erklärung

### Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertations selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

Stefanie Heil

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

---

Stefanie Heil